

Analysen zum transformierenden Potenzial des E4orf3-Proteins von Adenovirus Serotyp 5



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und vorklinische Medizin –
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Birgitt Täuber
aus Michelsneukirchen
Februar 2002

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig
und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Birgitt Täuber

Promotionsgesuch eingereicht am: 06. Februar 2002

Promotionskolloquium am: 15. Mai 2002

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Charalampos Aslanidis und Dr. Thomas Dobner

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Jürgen Heinze (Vorsitzender)

Prof. Dr. Charalampos Aslanidis (1. Prüfer, Erstgutachten)

Prof. Dr. Hans Wolf (2. Prüfer, Zweitgutachten)

Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer (3. Prüfer)

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	1
--------------------	----------

1 ZUSAMMENFASSUNG	4
--------------------------	----------

2 EINLEITUNG	6
---------------------	----------

2.1 ADENOVIREN	6
-----------------------	----------

2.1.1	KLASSIFIKATION	6
-------	----------------	---

2.1.2	STRUKTUR UND GENOMORGANISATION	7
-------	--------------------------------	---

2.1.3	PRODUKTIVER INFEKTIONSZYKLUS	8
-------	------------------------------	---

2.2 TRANSFORMATION UND ONKOGENITÄT HUMANER ADENOVIREN	9
--	----------

2.2.1	ONKOGENES POTENZIAL HUMANER ADENOVIREN	9
-------	--	---

2.2.2	TRANSFORMATION VON NAGERZELLEN IN KULTUR	10
-------	--	----

2.2.3	TRANSFORMATION HUMANER ZELLEN IN KULTUR	11
-------	---	----

2.2.4	PERSISTENZ UND DNA-INTEGRATION	12
-------	--------------------------------	----

2.2.5	STRUKTUR UND FUNKTION ADENOVIRALER ONKOPROTEINE	13
-------	---	----

2.2.5.1	E1-REGION	13
---------	-----------	----

2.2.5.2	E4-REGION	15
---------	-----------	----

2.3 VEKTORENTWICKLUNG	19
------------------------------	-----------

2.4 PODs	20
-----------------	-----------

2.4.1	PODs - SUBZELLULÄRE KOMPARTIMENTE	20
-------	-----------------------------------	----

2.4.2	POD – ZUSAMMENSETZUNG	21
-------	-----------------------	----

2.4.3	VIRUS-POD-WECHSELWIRKUNG	22
-------	--------------------------	----

2.5 AUFGABENSTELLUNG	25
-----------------------------	-----------

3 MATERIAL	26
-------------------	-----------

3.1 ZELLEN	26
-------------------	-----------

3.1.1	BAKTERIENSTÄMME	26
-------	-----------------	----

3.1.2	SÄUGERZELLEN	26
-------	--------------	----

3.2	ADENOVIREN	27
3.3	NUKLEINSÄUREN	28
3.3.1	OLIGONUKLEOTIDE	28
3.3.2	VEKTOREN	30
3.3.3	REKOMBINANTE PLASMIDE	31
3.4	ENZYME UND REAGENZIEN	32
3.5	ANTIKÖRPER	33
3.5.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	33
3.5.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	34
3.6	KOMMERZIELLE SYSTEME	34
3.7	GRÖßEN- UND MOLEKULARGEWICHTSSTANDARDS	35
3.8	TIERE	35
3.9	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	35
3.10	COMPUTERPROGRAMME UND DATENBANKEN	35
4	METHODEN	37

4.1	BAKTERIEN	37
4.1.1	KULTURBEDINGUNGEN UND LAGERUNG	37
4.1.2	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> NACH DER RUBIDIUMCHLORID-METHODE	38
4.1.3	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> DURCH ELEKTROPORATION	39
4.2	DNA-TECHNIKEN	41
4.2.1	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS <i>E. COLI</i>	41
4.2.2	PRÄPARATION GENOMISCHER DNA AUS KULTIVIERTEN ZELLEN	42
4.2.3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	42
4.2.4	DNA-AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	42
4.2.5	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	43
4.2.6	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	44
4.2.7	KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	45
4.2.7.1	SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENZYME	45
4.2.7.2	LIGATION UND TRANSFORMATION	46
4.2.7.3	IDENTIFIKATION REKOMBINANTER KLONE	46
4.2.7.4	DNA-SEQUENZIERUNG	46

4.3	PROTEIN-TECHNIKEN	47
4.3.1	RADIOAKTIVE MARKIERUNG DURCH IN-VITRO-TRANSKRIPTION/-TRANSLATION	47
4.3.2	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN <i>E. COLI</i>	47
4.3.3	GST-PULLDOWN	50
4.3.4	QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN	51
4.3.5	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	51
4.3.6	FÄRBUNG VON POLYACRYLAMIDGELEN	53
4.3.7	WESTERN BLOT	53
4.3.8	IMMUNPRÄZIPITATION	55
4.3.9	IMMUNFLUORESCENZ	57
4.3.9.1	FIXIERUNG MIT PARAFORMALDEHYD (PFA)	57
4.3.9.2	FIXIERUNG MIT METHANOL	58
4.4	ZELLKULTUR	59
4.4.1	KULTURBEDINGUNGEN UND LAGERUNG VON SÄUGERZELLEN	59
4.4.1.1	KULTIVIERUNG VON ETABLIERTEN SÄUGERZELLEN ALS EINSCHICHTKULTUREN	59
4.4.1.2	GEWINNUNG UND KULTIVIERUNG PRIMÄRER RATTENNIERENZELLEN	60
4.4.1.3	GEWINNUNG UND KULTIVIERUNG PRIMÄRER KANINCHENLINSENEPITHELZELLEN	60
4.4.1.4	LAGERUNG VON SÄUGERZELLEN	61
4.4.2	BESTIMMUNG DER GESAMT-ZELLZAHL	61
4.4.3	TRANSFEKTION VON SÄUGERZELLEN	62
4.4.3.1	KALZIUMPHOSPHAT-METHODE	62
4.4.3.2	LIPOSOMEN-METHODE	63
4.4.4	ERNTE UND AUFSCHLUSS VON SÄUGERZELLEN	63
4.4.5	TRANSFORMATION PRIMÄRER ZELLEN	64
4.4.6	ETABLIERUNG STABIL TRANSFORMIERTER ZELLINIEN	64
4.4.7	MUTAGENESE-VERSUCH	65
4.4.8	INFEKTION MIT ADENOVIREN	66
4.4.9	WACHSTUMSKURVEN	66
4.4.10	MORPHOLOGIE	67
4.5	TIERVERSUCHE	67
4.5.1	TUMORINDUKTION	67
4.5.2	BESTIMMUNG DES TUMORWACHSTUMS	67
4.6	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	68
4.6.1	HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN	68
4.6.2	HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG (H & E)	68
4.7	LUZIFERASE-VERSUCH	68

5	ERGEBNISSE	70
5.1	TRANSFORMATION PRIMÄRER ZELLEN DURCH PROTEINE DER E1- UND E4-REGION	70
5.1.1	NACHWEIS DER E1- UND E4-PROTEINE IN ETABLIERTEN ZELLINIEN	71
5.1.2	NACHWEIS VIRALER DNA-SEQUENZEN IN ETABLIERTEN ZELLINIEN	74
5.2	E1A/E4-VERMITTELTE „Hit & Run“-TRANSFORMATION	75
5.2.1	BESTIMMUNG DES MUTAGENEN POTENZIALS VON E4ORF3 UND E4ORF6	76
5.3	ANALYSEN ZUM TRANSFORMIERENDEN POTENZIAL DES AD5 E4ORF3-PROTEINS	79
5.3.1	INTERAKTION VON E4ORF3 MIT DEN POD-STRUKTUREN	79
5.3.2	IDENTIFIZIERUNG E4ORF3-ASSOZIIERTER ZELLULÄRER PROTEINE	81
5.3.3	BINDUNG VON E4ORF3 AN P300	82
5.3.3.1	IMMUNPRÄZIPITATION VON P300 UND E4ORF3	82
5.3.3.2	IMMUNFLUORESCENZANALYSEN ZUM NACHWEIS DER P300-E4ORF3-INTERAKTION	83
5.3.4	IDENTIFIZIERUNG DER P300-INTERAKTIONSDOMÄNEN	85
5.3.4.1	HERSTELLUNG VON GST-P300 FUSIONSPROTEINEN	85
5.3.4.2	EXPRESSION DER GST-P300-FUSIONSPROTEINE	86
5.3.4.3	IN-VITRO-BINDUNGSSTUDIE ZUR IDENTIFIZIERUNG DER P300-INTERAKTIONSDOMÄNEN	87
5.3.5	EINFLUSS VON E4ORF3 AUF DIE P300-AKTIVITÄT	89
5.3.6	KOMPLEMENTATION EINER P300-BINDUNGSDEFIZIENTEN E1A-MUTANTE DURCH E4ORF3	91
5.3.7	UNTERSUCHUNG DER E4ORF3-P300-INTERAKTION VERSCHIEDENER ADENOVIRUS SEROTYPEN	93
5.3.7.1	IMMUNFLUORESCENZANALYSEN ZUR E4ORF3-P300-INTERAKTION VERSCHIEDENER SEROTYPEN	93
5.3.7.2	IN-VITRO-BINDUNGSSTUDIE VON P300 MIT DEN E4ORF3-PROTEINEN VERSCHIEDENER SEROTYPEN	94
5.3.7.3	EINFLUSS DER E4ORF3-PROTEINE VERSCHIEDENER SEROTYPEN AUF DIE TRANSKRIPTIONS-AKTIVITÄT VON P300	95
5.4	IDENTIFIZIERUNG FUNKTIONELL AKTIVER BEREICHE IM E4ORF3-PROTEIN DURCH MUTATIONS-ANALYSE	97
5.4.1	KONSTRUKTION UND EXPRESSION VON E4ORF3-MUTANTEN	98
5.4.1.1	KONSTRUKTION DER E4ORF3-MUTANTEN	98
5.4.1.2	EXPRESSION DER E4ORF3-MUTANTEN	98
5.4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR TRANSFORMATION DER E4ORF3-MUTANTEN	100
5.4.3	UNTERSUCHUNG DER E4ORF3-MUTANTEN BEZÜGLICH DER P300-INTERAKTION	101
5.4.3.1	IMMUNFLUORESCENZANALYSEN	101
5.4.3.2	IN-VITRO-BINDUNGSSTUDIEN	103
5.4.3.3	REPORTERGENVERSUCHE	104
5.5	ETABLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG TRANSFORMIERTER KANINCHENLINSEN-EPITHELZELLEN	105

5.5.1	TRANSFORMATION PRIMÄRER KANINCHENLINSENEPITHELZELLEN	107
5.5.2	ETABLIERUNG STABIL TRANSFORMierter RLE-ZELLINIEN	108
5.5.3	EXPRESSIONSNACHWEIS VIRALER ONKOGENE IN STABIL TRANSFORMierten RLE-ZELLINIEN	110
5.5.3.1	WESTERN BLOT-ANALYSE	110
5.5.3.2	IMMUNFLUORESZENZANALYSEN	111
5.5.4	INTERAKTION VON E4ORF3 MIT DEN POD-STRUKTUREN IN STABIL TRANSFORMierten RLE-ZELLINIEN	117
5.5.5	MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN STABIL TRANSFORMierter RLE-ZELLINIEN	118
5.5.6	VERÄNDERUNGEN DER ZELLULÄREN WACHSTUMSEIGENSCHAFTEN <i>IN VITRO</i>	120
5.5.7	INDUZIerte STEIGERUNG VON TUMORIGENITÄT UND MALIGNEN TUMOR-WACHSTUM <i>IN VIVO</i>	121
5.5.7.1	NACKTMAUSVERSUCHE	121
5.5.7.2	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	123
6	DISKUSSION	125
6.1	MECHANISMEN ADENOVIRUS-VERMITTELT ER ONKOGENESE	125
6.1.1	E1A/E4-VERMITTELTE „ <i>HIT & RUN</i> “-TRANSFORMATION	126
6.1.2	E1A/E1B/E4ORF3-VERMITTELTE HYPERTRANSFORMATION	128
6.2	P300 EIN ZELLULÄRER INTERAKTIONSPARTNER VON AD5 E4ORF3	129
6.2.1	MODULATION DER FUNKTION UND SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON P300	130
6.2.2	MECHANISMEN DER AD5 E5ORF3-VERMITTELTEN TRANSFORMATION	131
6.3	Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse für Virologie und Medizin	134
6.4	HERSTELLUNG E1/E4-KOMPLEMENTIERENDER HELFER-ZELLINIEN	135
7	LITERATURVERZEICHNIS	139

VERÖFFENTLICHUNGEN

DANKSAGUNG

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AD	<i>adenoid degeneration</i>
Ad5, Ad9 usw.	Adenovirus Serotyp 5, 9 usw.
ALV	Abelson Leukämie Virus
APC	<i>adenoidal-pharyngeal-conjunctival disease</i>
APL	akute promyelozytische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
ARD	<i>acute respiratory disease</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bid.	bidest
BR	Bromodomäne
BRK-Zellen	Rattennierenzellen (<i>baby rat kidney cells</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad in Celsius
ca.	zirka
CBP	CREB (<i>cAMP responsive element binding protein</i>) bindendes Protein
CH1/CH3	Cystein-Histidin-reiche Zinkfinger motive
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> Zellen
CR1, 2, 3	konservierte Region 1, 2, 3 (<i>conserved region 1, 2, 3</i>)
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
DA	Dignam Puffer
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
dNTP	Desoxynukleosid-5'-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E1, 2, 3, 4	frühe Region 1, 2, 3, 4 (<i>early region 1, 2, 3, 4</i>)
EBV	Epstein Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
fw	forward
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde (<i>hour</i>)
HA	Influenzavirus Hämagglutinin-Epitop
HAT	Histonazetyltransferase
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HDV	Hepatitis-D-Virus
HEK	humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonal kidney cells</i>)

HEL	humane embryonale Lungenzellen (<i>human embryonal lung cells</i>)
HER	humane embryonale Retinoblasten (<i>human embryonal retinoblasts</i>)
HFV	humanes Spumavirus (<i>human foamy virus</i>)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HHV8	humanes Herpesvirus Typ 8
HIV-1	humanes Immundefizienzvirus Typ-1
HPV	humanes Papillomavirus
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ-1
HTLV-1	humanes T-Zell Leukämie Virus Typ-1
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
kb	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
Kr <i>bodies</i>	<i>Kremer bodies</i>
L1, 2, 3, 4, 5	späte Region 1, 2, 3, 4, 5 (<i>late region 1, 2, 3, 4, 5</i>)
LB	Luria-Bertani Medium (<i>L-Broth Medium</i>)
LCMV	Virus der lymphozytären Choriomeningitis
M	Molar (mol/l)
min	Minute (<i>minute</i>)
MLP	<i>major late promotor</i>
MLTU	<i>major late transcription unit</i>
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunde (<i>millisecond</i>)
mu	<i>map unit</i> (1 mu = 360 nt)
NB	<i>nuclear body</i>
ND10	<i>nuclear dot 10</i>
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
orf	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
P	E4-Promotor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PML	Protein der promyelozytischen Leukämie
POD	PML <i>oncogenic domain</i>
PP2A	Proteinphosphatase 2A
pRb	Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein
RAR α	<i>retinoic acid receptor α</i>
rev	<i>reverse</i>
RI	<i>respiratory illness</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RLE-Zellen	Kaninchenlinsenepithelzellen (<i>rabbit lens epithelial cells</i>)
s	Sekunde (<i>second</i>)
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)

sog.	sogenannt
SUMO-1	<i>small ubiquitin modifier 1</i>
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAg	großes T(umor)-Antigen von SV40
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TP	terminales Protein
TPL	<i>tripartite leader</i>
TTP	Thymin-5'-Triphosphat
U	Unit (Aktivitätseinheit von Enzymen)
UpM	Umdrehungen pro Minute
VA RNA	<i>virus-associated RNAs</i>
v/v	Volumeneinheit pro Gesamtvolumen (<i>volume per volume</i>)
vgl.	Vergleich
WB	<i>Western Blot</i>
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Gesamtvolumen (<i>weight per volume</i>)
z. B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen zum transformierenden Potenzial humaner Adenoviren zeigen erstmals, dass zwei virale Genprodukte der frühen Region 4 - E4orf3 und E4orf6 - von Adenovirus Serotyp 5 (Ad5) transformierende Eigenschaften aufweisen, die zur „*Hit & Run*“-Transformation primärer BRK-Zellen beitragen. Den onkogenen Aktivitäten beider E4-Proteine liegen mutagene Wirkmechanismen zugrunde, die wahrscheinlich über ein komplexes Netzwerk unterschiedlicher Proteinwechselwirkungen mit zellulären Regulatoren des Zellzyklus, der Apoptose und der DNA-Reparatur vermittelt werden.

Auf molekularer Ebene werden die mutagenen Eigenschaften von E4orf6 vermutlich durch mehrere Aktivitäten reguliert, die sowohl die transkriptionsaktiven Funktionen von p53, als auch die Stabilität des zellulären Tumorsuppressorproteins verändern. Dagegen beruht die Fähigkeit von E4orf3 zur kooperativen Transformationsinitiation und „*Hit & Run*“-Mutagenese wahrscheinlich auf der Interaktion mit zellulären Komponenten subnukleärer Multiproteinkomplexe, die als PML *oncogenic domains* (PODs) bezeichnet werden. In diesem Zusammenhang konnte mit dem POD-assoziierten Transkriptionskoaktivator p300 erstmals ein zellulärer Interaktionspartner von E4orf3 identifiziert werden, der bekanntermaßen auch ein Zielprotein der E1A-Onkoproteine darstellt. Immunfluoreszenz- und funktionelle Promotor/Reporter-Analysen zeigen, dass das Ad5-Protein p300 in reorganisierte POD-Strukturen sequestriert und die transkriptionsaktiven Eigenschaften des Tumorsuppressorproteins inhibiert. Da auch die E1A-Proteine die p300-vermittelte Transkriptionsaktivierung blockieren, muss man annehmen, dass E4orf3 mit E1A redundante Aktivitäten aufweist. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass die Binderegionen von E1A und E4orf3 im p300-Protein teilweise überlappen und die Tatsache, dass das Ad5 E4orf3-Protein eine p300-bindungsdefiziente, transformationsdefekte E1A-Mutante (E1delN) in BRK-Transformationsexperimenten komplementiert. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die E4orf3-Proteine humaner Adenoviren eine zu E1A redundante Funktion besitzen und lassen

vermuten, dass die onkogenen und mutagenen Eigenschaften des Ad5-Proteins über die Modulation der subnukleären Lokalisation und Funktion von p300 vermittelt werden. Da alle viralen Proteine, die bisher mit mutagenen Eigenschaften und/oder „Hit & Run“-Transformation in Verbindung gebracht werden, bekanntermaßen die Funktion von PODs und/oder p53 verändern, muss man annehmen, dass diesen Aktivitäten allgemein gültige Wirkmechanismen virusinduzierter Mutagenese und Transformation zugrunde liegen. Im Hinblick auf den zunehmenden Einsatz humaner Adenoviren als Transfersystem in der Gen- und Tumorthherapie stellt das onkogene und mutagene Potenzial beider E4-Proteine ein Sicherheitsrisiko dar. Auf der Grundlage dieser Arbeiten wurde daher mittlerweile empfohlen, die E4-Region aus allen klinisch relevanten Adenovirus-Vektoren zu entfernen.

Trotz einer verbesserten Sicherheit der E1/E4-modifizierten Adenovirus-Vektoren wird der breite Einsatz dieser Vektorgruppe noch immer durch zahlreiche Probleme limitiert. Besonders kritisch gestaltet sich die Anzucht der Virusmutanten, da bislang keine E1/E4-komplementierenden Helfer-Zelllinien existieren, die eine effiziente Vermehrung dieser Vektoren ermöglichen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit auch versucht Helfer-Zelllinien zu etablieren, die stabil die E1A/E1B- und E4-Gene exprimieren. Durch Transformationsexperimente auf der Basis primärer Kaninchenepithelzellen (RLEC) konnten stabil E1/E4-transformierte, permissive Zelllinien etabliert werden, die erstmals eine Vermehrung von E1/E4-Virusmutanten zu hochtitrigen Virusstocks ermöglichen. Somit ist eine Grundvoraussetzung für den Einsatz dieser neuen Vektorklasse gegeben. Die Analyse der RLEC-Klone zeigt, dass sie analog zu transformierten, nicht permissiven Epithelzellen aus Ratten zusätzliche Merkmale vollständig transformierter Zellen aufweisen. Dazu gehören morphologische Veränderungen, beschleunigtes Wachstum in Kultur sowie erhöhte Tumorigenität in Nacktmäusen. Interessanterweise zeigen Immunfluoreszenzanalysen zur subzellulären Lokalisation der viralen Onkoproteine eine Verteilung, die der in virusinfizierten humanen Zellen sehr ähnlich ist. Dies lässt vermuten, dass die beobachteten Unterschiede in der Permissivität transformierter Zellen durch die subzelluläre Verteilung der E1B- und E4-Proteine determiniert wird.

2 Einleitung

2.1 Adenoviren

2.1.1 Klassifikation

Adenoviren wurden erstmals zu Beginn der fünfziger Jahre aus adenoidem Gewebe und dem Rachensekret respiratorisch erkrankter Personen isoliert (Rowe *et al.*, 1953; Hilleman und Werner, 1954). Nachdem die ersten Virusisolate als *adenoid degeneration* (AD), *respiratory illness* (RI), *adenoidal-pharyngeal-conjunctival* (APC) oder *acute respiratory disease* (ARD) bezeichnet wurden, fasste man sie später aufgrund gemeinsamer Merkmale und Eigenschaften zur Gruppe der Adenoviren zusammen (Huebner *et al.*, 1954; Enders *et al.*, 1956).

Die Familie der *Adenoviridae* umfasst derzeit über 100 verschiedene, serologisch unterscheidbare Virustypen, die wiederum in zwei Gattungen eingeteilt werden: die Aviadenoviren, welche in verschiedenen Vogelarten vorkommen, und die Mastadenoviren, zu denen die Säuger-Adenoviren einschließlich der bis heute bekannten 50 verschiedenen humanen Serotypen zählen (zur Übersicht: Horwitz, 1996). Außerdem wurde kürzlich vorgeschlagen, eine dritte Gattung, die Atadenoviren, einzuführen (Benko und Harrach, 1998). Basierend auf der Onkogenität im immunkompetenten Versuchstier und einer Reihe weiterer Kriterien (Hämagglutination, GC-Gehalt und Sequenzhomologien der viralen DNA) werden humane Adenoviren in sechs Subgruppen (A-F) unterteilt (zur Übersicht: Graham, 1984; Shenk, 1996; Modrow und Falke, 1997). Die Adenoviren des Menschen verursachen sowohl lytische als auch persistierende Infektionen und sind mit einer Vielzahl klinischer Symptome assoziiert (zur Übersicht: Horwitz, 1996). Die durch sie verursachten Krankheitsbilder umfassen okuläre, respiratorische und gastroenterale Erkrankungen, Zystitis sowie persistierende Harnwegsinfektionen, Hepatitis und Meningoenzephalitis. In sehr seltenen Fällen können Adenovirus-Infektionen bei immunsupprimierten Personen auch zum Tode führen.

2.1.2 Struktur und Genomorganisation

Adenoviren bestehen aus einem 80 – 110 nm großen ikosaedrischen Proteinkapsid ohne Membranhülle und enthalten ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom von 34 – 44 kBp Länge, das in 100 Kartierungseinheiten (mu, *map units*) unterteilt wird (1 mu = 360 nt; zur Übersicht: Shenk, 1996). Ein charakteristisches Merkmal der Adenovirus-Kapside sind die antennenartigen Fortsätze (*spikes*), die an den 12 Ecken des Ikosaeders hervorragen und die Adsorption des Virus an den Rezeptor der Wirtszelle ermöglichen (Abb. 1; Bergelson *et al.*, 1997).

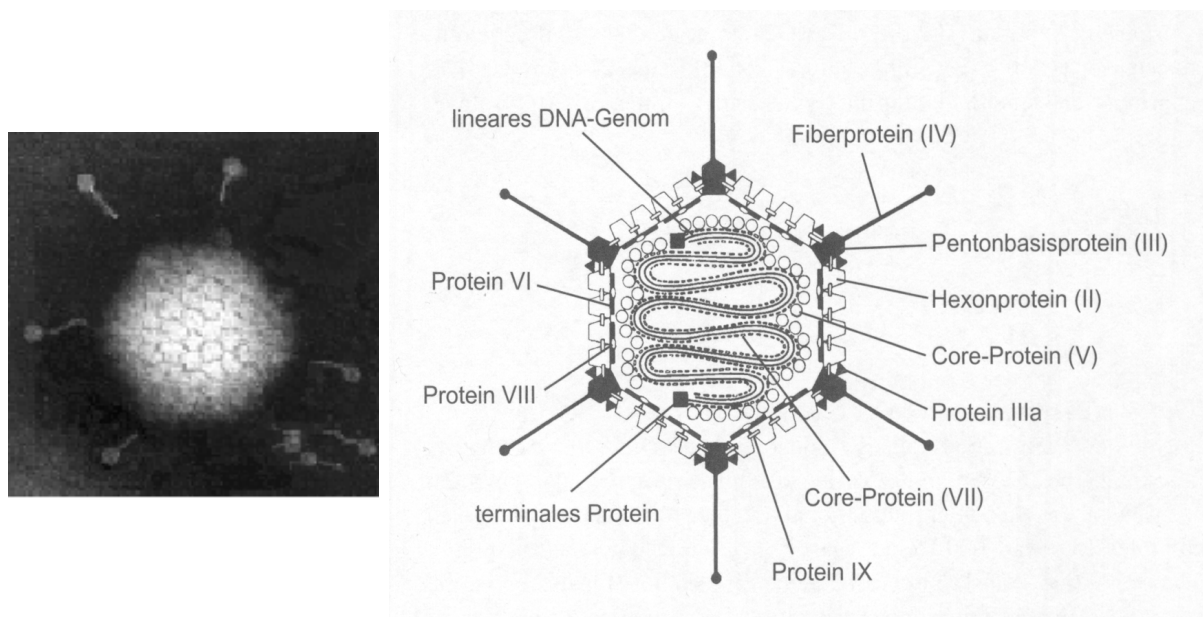


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Adenovirus

In der linken Abbildung ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Adenovirus dargestellt. Zu erkennen ist das ikosaedrische Kapsid mit den Fiberproteinen. Die rechte Darstellung zeigt einen schematischen Querschnitt durch das Adenovirus-Partikel (Modrow und Falke, 1997).

Zu den bis heute am ausführlichsten untersuchten Adenoviren gehören die nah verwandten Serotypen 2 und 5 (Ad2 und Ad5) der Subgruppe C. Die Genome von Ad2 und Ad5 enthalten neun Transkriptionseinheiten (Abb. 2), die für etwa 40 verschiedene regulatorische und strukturelle Proteine und zwei RNAs (VA RNAs, *virus-associated RNAs*) kodieren. Sequenzvergleiche mit anderen Serotypen zeigen, dass alle humanen Adenoviren eine ähnliche Genomorganisation besitzen und nahezu die gleichen Genprodukte exprimieren (zur Übersicht: Shenk, 1996).

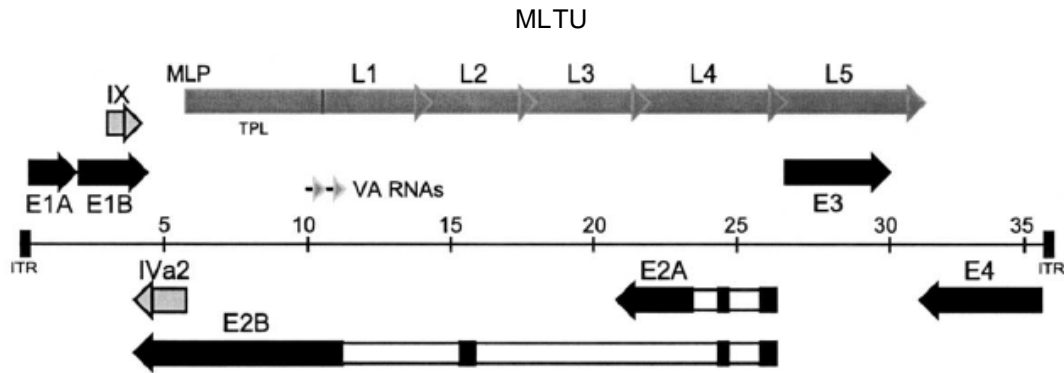


Abb. 2 Die Genomorganisation von Adenovirus Serotyp 5

Dargestellt ist die Lage der frühen Gene (E1A, E1B, E2A/B, E3, E4, IX und IVa2) und der späten Transkriptionseinheit (MLTU). Die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung auf den beiden kodierenden DNA-Strängen des viralen Genoms an. Die späten Gene (L1 bis L5) werden erst nach dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation von einem gemeinsamen Promotor (MLP) aus transkribiert und kodieren hauptsächlich für Strukturproteine des Virions. Die frühen viralen Transkriptionseinheiten sind bereits vor Beginn der DNA-Synthese aktiv und besitzen regulatorische Funktionen in Bezug auf DNA-Replikation (E2), Modulation des Immunsystems (E3) sowie Transkription, RNA-Prozessierung und Zellzyklus-Kontrolle (E1A/E1B und E4). MLTU: *major late transcription unit*; MLP: *major late promoter*; TPL: *tripartite leader*; VA RNAs: *virus-associated RNAs*; ITR: *inverted terminal repeat*.

2.1.3 Produktiver Infektionszyklus

Adenoviren können Zellen sowohl lytisch als auch latent infizieren. Während der lytische Infektionszyklus im weiteren Verlauf den Zelltod herbeiführt, ist das Virus im latenten Zustand fähig in der Zelle zu persistieren ohne eine Immunantwort hervorzurufen. Adenoviren können sich teilende, aber auch differenzierte Zellen infizieren. Bevorzugte Zielzellen sind jedoch vor allem postmitotisch ruhende Epithelzellen des Hals-, Nasen-, Rachenraumes, der Lunge und des Verdauungstraktes. In Gewebekultur infizieren Adenoviren eine Vielzahl unterschiedlichster Tumorzelllinien und primäre Zelltypen. Der produktive Infektionszyklus wird unterteilt in eine frühe und eine späte Phase. Die frühe Phase der Infektion beginnt mit der Interaktion des Virus mit der Wirtszelle und umfasst Adsorption, Penetration, Transkription und Translation bestimmter früher Gene. Dabei werden mehr als 20 regulatorische Proteine produziert, die von fünf Transkriptionseinheiten kodiert werden. Bei diesen handelt es sich um die Transkriptionseinheiten von E1A, E1B, E2, E3 und E4, aus deren jeweiligen

Vorläufer-mRNAs durch differenzielle Spleißprozesse viele verschiedene mRNAs gebildet werden. Die resultierenden Proteine werden benötigt, um optimale Bedingungen für die virale DNA-Synthese und die Produktion viraler Strukturproteine in der späten Phase der Infektion zu schaffen. Dabei vermitteln sie die virale DNA-Replikation (E2), induzieren die Zellzyklusprogression (E1A und E1B), wirken verschiedenen antiviralen Schutzmechanismen der Zelle, beispielsweise der Apoptose (E1B), entgegen und erschweren ein Erkennen der virusinfizierten Zelle durch das Immunsystem (E3) (zur Übersicht: Burgert und Blusch, 2000; Horwitz, 2001). Mit dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation beginnt die späte Phase des lytischen Infektionszyklus. Sie ist gekennzeichnet durch die Expression der späten viralen Gene der *major late transcription unit* (MLTU), dem gleichzeitigen Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host shut off*) und dem Zusammenbau von Nachkommenviren. In Gewebekultur endet der produktive Vermehrungszyklus nach etwa 24 Stunden mit der Lyse der Wirtszelle und resultiert in der Freisetzung von bis zu 10 000 Viruspartikel pro Zelle (zur Übersicht: Shenk, 1996).

2.2 Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren

2.2.1 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren

Bis heute konnte kein Zusammenhang zwischen der Entstehung menschlicher Tumorerkrankungen und humanen Adenoviren hergestellt werden (Mackey *et al.*, 1976; Mackey *et al.*, 1979; Wold *et al.*, 1979; Chauvin *et al.*, 1990). Jedoch zeigten bereits 1962 Trentin und Mitarbeiter, dass das Adenovirus Serotyp 12 als erstes humanpathogenes Virus onkogene Eigenschaften in neugeborenen Hamstern aufweist (Trentin *et al.*, 1962). In weiteren Arbeiten konnte nur für bestimmte Serotypen (12, 18, 31) onkogenes Potenzial nachgewiesen werden (zur Übersicht: Graham, 1984). Verschiedene Serotypen wurden somit, abhängig von der Effizienz und Latenzzeit der Tumorinduktion, als nicht onkogen, schwach onkogen oder hochonkogen eingestuft (Tab. 1). Als hochonkogen gelten Viren, die mit sehr großer Effizienz und kurzer Latenzzeit Tumoren in Nagetieren induzieren. Virustypen

werden hingegen als schwach onkogen eingestuft, wenn eine Tumorinduktion nur unregelmäßig und mit langen Inkubationszeiten beobachtet werden kann. Viren der Subgruppe D sind generell nicht onkogen. Einzige Ausnahme bilden die Serotypen 9 und 10, welche östrogenabhängige Mammakarzinome in weiblichen Ratten induzieren (Ankerst *et al.*, 1974a, b; Jonsson und Ankerst, 1977; Ankerst und Jonsson, 1989; Javier *et al.*, 1991).

ONKOGENITÄT IN TIEREN	SUBGRUPPE	SEROTYPEN	ART DES TUMORS
hochonkogen	A	12, 18, 31	undifferenzierte Sarkome
	D	9, 10	Fibroadenome
schwach onkogen	B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	undifferenzierte Sarkome
nicht onkogen	C - F	C (1, 2, 5, 6); D (8, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51); E (4); F (40, 41)	keine

Tab. 1 Übersicht über hochonkogene, schwach und nicht onkogene Adenoviren

2.2.2 Transformation von Nagerzellen in Kultur

Ungeachtet ihres Potenzials, Tumoren in Nagetieren zu erzeugen, sind sowohl onkogene als auch nicht onkogene Adenoviren in der Lage, Zellen in Kultur zu transformieren. Dabei werden die transformierten Zellen morphologisch so verändert, dass sie als dichte und vielschichtige Kolonien (*Foci*) auswachsen und verschiedene phänotypische Merkmale onkogener Transformation aufweisen. Es können jedoch nicht alle dieser transformierten Zelllinien nach Inokulation in Nagetiere Tumoren erzeugen. Im Gegensatz zu Ad12- transformierten Zellen, die in syngen, immunkompetenten Ratten Tumoren bilden, können durch Ad2- oder 5- transformierte Rattenzellen keine Tumoren in Ratten erzeugen. Allerdings können Ad2-/Ad5- und Ad12-transformierte Zellen in thymusdefizienten Nacktmäusen, denen die MHC-Klasse I-restringierten zytotoxischen T-Zellen fehlen, Tumoren induzieren (Bernards *et al.*, 1983). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tumorigenität von Adenovirus-transformierten Zellen hauptsächlich von den thymusabhängigen

CTL-Komponenten des Immunsystems der Wirtstiere beeinflusst wird (Raska und Gallimore, 1982; Bernards *et al.*, 1983; Cook und Lewis, 1987). Neuen Daten zufolge muss die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden, dass zusätzliche Mechanismen bestehen, die eine Tumorbildung durch Adenovirus-transformierte Zellen fördern. Diese werden durch die Expression von viralen Genprodukten beeinflusst, die in der E4-Region kodiert sind (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001b).

2.2.3 Transformation humaner Zellen in Kultur

Trotz ihres onkogenen Potenzials in Tieren und ihrer Fähigkeit, primäre Nagerzellen in Kultur vollständig zu transformieren, konnte bisher kein Zusammenhang zwischen Adenoviren und der Tumorentstehung beim Menschen gefunden werden. Die Tatsache, dass viele Versuche fehlschlagen, humane Zellen in Kultur mit Adenovirus zu transformieren, weist darauf hin, dass eine abortive Infektion einer der Faktoren ist, der mit einer hocheffizienten Transformation von nicht permissiven Nagerzellen assoziiert ist. Interessanterweise ist die Transformation humaner Zellen mit nicht infektiösen, subgenomischen, viralen DNA-Fragmenten im Vergleich zu Nagerzellen ebenfalls außerordentlich ineffizient. Dies lässt darauf schließen, dass Permissivität keinen determinierenden Faktor für die Transformationseffizienz darstellt. Die molekularen Grundlagen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt, obwohl bereits einige Modelle diskutiert wurden (Shenk, 1996; Hutton *et al.*, 2000). Bis heute konnten nur wenige humane Zellen erfolgreich mit Ad12- oder Ad5-DNA-Fragmenten transformiert werden. Bei diesen Zellen handelt es sich im Allgemeinen um embryonale Zellen, wie z. B. humane embryonale Nierenzellen (HEK, *human embryonal kidney cells*; Graham *et al.*, 1977; Whittaker *et al.*, 1984), humane embryonale Lungenzellen (HEL, *human embryonal lung cells*; van den Heuvel *et al.*, 1992), humane embryonale Retinoblasten (HER, *human embryonal retinoblasts*; Byrd *et al.*, 1982; Gallimore *et al.*, 1986; Fallaux *et al.*, 1996; Fallaux *et al.*, 1998) und Amniozyten (Schiedner *et al.*, 2000). Reproduzierbar aber weniger effizient als Nagerzellen lassen sich jedoch nur humane, embryonale Retinoblasten und Amniozyten transformieren.

2.2.4 Persistenz und DNA-Integration

Die meisten Adenovirus-induzierten Tumoren, Tumorzelllinien und transformierten Zellklone zeichnen sich durch die Persistenz der viralen DNA über chromosomale Integration und die Expression von virusspezifischen Antigenen aus. Dementsprechend folgt die adenovirale Transformation dem klassischen Konzept der viralen Onkogenese, welche auf der Persistenz der viralen Gene in transformierten Zellen beruht (zur Übersicht: Graham, 1984). Allerdings wurde in Einzelfällen beobachtet, dass die ständige Anwesenheit und Expression adenoviraler Sequenzen nicht unbedingt für die Aufrechterhaltung des onkogenen Phänotyps verantwortlich ist (Paraskeva und Gallimore, 1980; Kuhlmann *et al.*, 1982; Paraskeva *et al.*, 1982; Pfeffer *et al.*, 1999). Während die Mehrzahl der durch Adenovirus Serotyp 9 und 12 entstandenen Tumorzellen eine oder mehrere Kopien des viralen Genoms enthalten (Brusca *et al.*, 1984; Graham, 1984; Javier *et al.*, 1991), findet man in den meisten Nagerzellen, die durch Adenovirus Serotyp 2 oder 5 transformiert wurden, nur Teile des viralen Genoms (Graham, 1984). Dabei enthalten alle onkogen transformierten Zellen konsistent das linke Ende des viralen Genoms mit der E1-Region (zur Übersicht: Tooze, 1981; Graham, 1984). Ebenso können in den meisten transformierten Zelllinien, die nach Transfektion rekombinanter Plasmide etabliert wurden, die E1A- und E1B-Onkogene in integrierter Form nachgewiesen werden. Bei einer anderen oft beobachteten Umstrukturierung der viralen DNA in transformierten Zellen findet man das linke und rechte Ende des Genoms gemeinsam integriert vor. Aufgrund der Tatsache, dass einzig die E1-Region in virustransformierten Zellen konsistent integriert und allein die Transfektion von Zellen in Kultur mit den E1-Genen zu einer onkogenen Transformation führt, ist anzunehmen, dass die E1-Genprodukte die Initiation der Transformation vermitteln und Funktionen besitzen, die zur Aufrechterhaltung einiger phänotypischer Merkmale transformierter Zellen benötigt werden. Einzige Ausnahme stellt Adenovirus Serotyp 9 der Subgruppe D dar, dessen alleinige onkogene Determinante in der frühen Region 4 kodiert wird (Javier *et al.*, 1992). Letzten Ergebnissen zufolge liegt auch das onkogene Potenzial der Subgruppe A- und C-Adenoviren nicht ausschließlich in der E1-Region. Eine neue Rolle kommt hier den Genprodukten der E4-Region zu (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001a, b).

2.2.5 Struktur und Funktion adenoviraler Onkoproteine

2.2.5.1 E1-Region

Das onkogene Potenzial humaner Adenoviren wird traditionell der E1-Region zugeschrieben, die am linken Ende des adenoviralen Genoms lokalisiert ist (siehe Abb. 2). Diese Region kodiert für die Genprodukte der E1A- und E1B-Transkriptionseinheiten und ist für eine vollständige morphologische Transformation ausreichend (zur Übersicht: Bernards und van der Eb, 1984; Graham, 1984; Shenk, 1996). Dahingegen wird eine Immortalisierung von Nagerzellen allein durch die E1A-Genprodukte herbeigeführt (Houweling *et al.*, 1980). Die E1A-Transkriptionseinheit kodiert für zwei nukleäre, multifunktionelle Phosphoproteine (E1A 12S und E1A 13S), welche den proliferativen Status von Zellen beeinflussen können. Beide E1A-Proteine sind in der Lage, Zellen zu immortalisieren, die Zellzyklusbarrieren aufzuheben, und zusammen mit anderen viralen oder zellulären Onkogenen Zellen zu transformieren. Diese Funktionen werden durch Interaktionen mit wachstumsinhibitorischen und genregulatorischen Proteinen vermittelt (zur Übersicht: Russell, 2000). Dabei überlappen die für die Transformation zuständigen Domänen mit denen, welche für die Interaktionen verantwortlich sind (Abb. 3). Diese Bereiche umfassen den nicht konservierten Aminoterminus (N) sowie zwei Regionen, die zwischen den verschiedenen Serotypen konserviert sind: CR1 und CR2 (CR, *conserved region*). Eine dritte Region (CR3) ist allein in den E1A 13S-Genprodukten vorhanden und nicht für die transformierenden Eigenschaften von Bedeutung (zur Übersicht: Berk, 1986; Flint und Shenk, 1989). Somit ist das E1A 12S-Protein für eine Immortalisierung und partielle Transformation ausreichend.

Neben den transformierenden Eigenschaften besitzen die E1A-Genprodukte auch die Fähigkeit Apoptose einzuleiten, indem sie die Akkumulation und Aktivierung des zellulären Tumorsuppressors p53 induzieren (zur Übersicht: White, 1995; Chinnadurai, 1998; White, 1998). Jedoch ist E1A auch in der Lage p53-unabhängige Apoptosewege zu aktivieren (Teodoro *et al.*, 1995; Marcellus *et al.*, 1996).

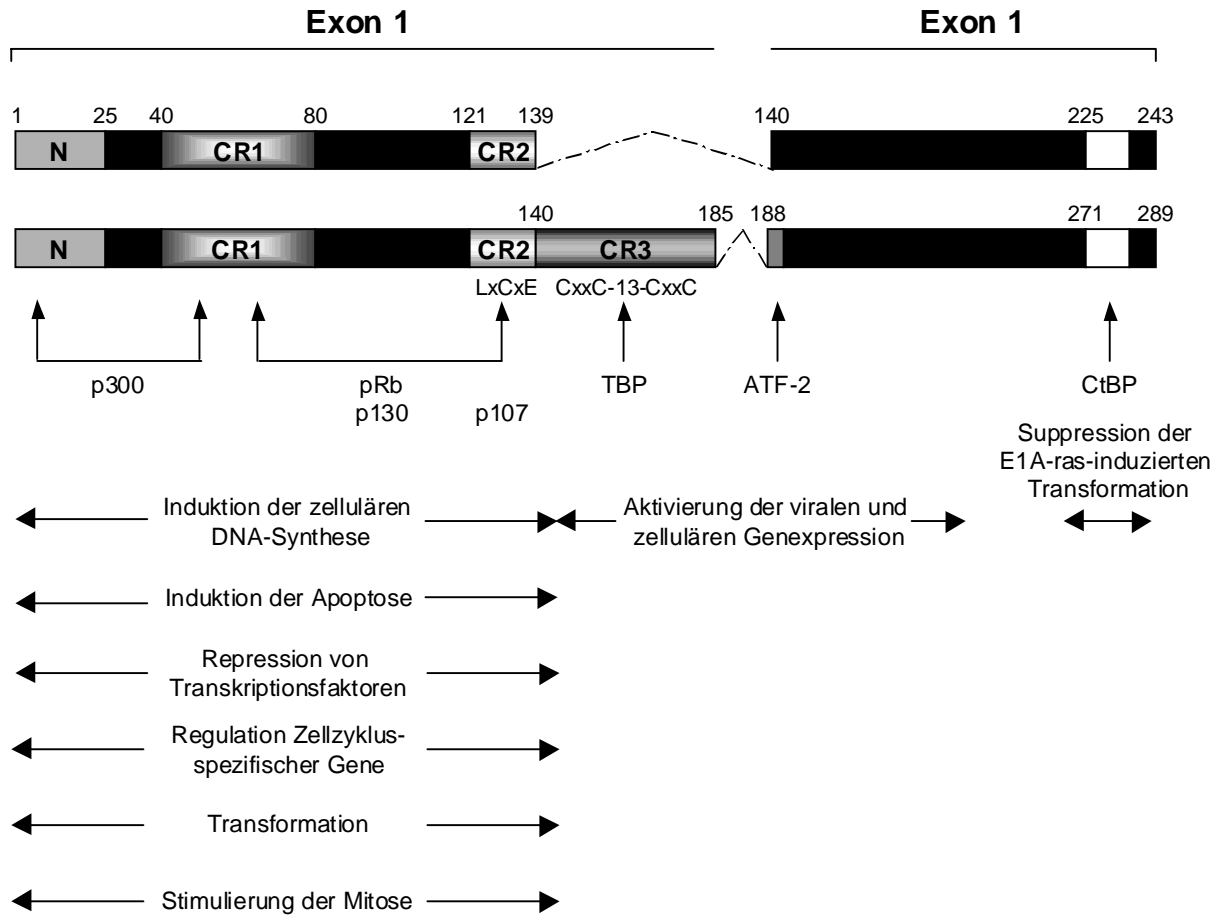


Abb. 3 Domänenstrukturen der E1A-Genprodukte von Adenovirus Serotyp 5

Dargestellt sind die E1A 12S- (oben) und 13S-Transkripte (unten) sowie die funktionellen Regionen der abgeleiteten Polypeptide. Das E1A 12S-Protein unterscheidet sich von dem 13S-Protein durch das Fehlen der CR3-Domäne. Die Zahlen oberhalb der schematisch dargestellten Polypeptide entsprechen den Aminosäurepositionen. Angegeben sind zelluläre Faktoren, die an die konservierten Domänen der E1A-Proteine binden sowie die Funktionen, die den Domänen zugeordnet werden können.

Zur vollständigen morphologischen Transformation primärer Zellen sind zusätzlich zu den E1A-Genprodukten auch die E1B-Proteine notwendig. Die E1B-Transkriptionseinheit von Adenovirus Serotyp 5 kodiert für zwei Onkoproteine, E1B-55 kDa und E1B-19 kDa. Beide Proteine transformieren in Kooperation mit E1A primäre Nagerzellen, wobei sie unabhängig voneinander, jedoch additiv wirken (Gallimore *et al.*, 1985; McLorie *et al.*, 1991). Dabei spielt die Funktion beider E1B-Proteine eine Rolle, auf unterschiedlichen Wegen den E1A-induzierten Zelltod zu blockieren (zur Übersicht: Chinnadurai, 1998; White, 1998). Das E1B-19 kDa-Protein ist dem zellulären Proto-Onkogen Bcl-2 funktionell ähnlich und interagiert mit den

Apoptoseregulatoren Bax und CED4. Obwohl E1B-19 kDa nicht an p53 bindet, kann es über einen noch unbekannten Mechanismus die p53-induzierte Transrepression aufheben, die über den Carboxyterminus des Tumorsuppressorproteins vermittelt wird. Im Gegensatz dazu interagiert E1B-55 kDa direkt mit der aminoterminalen Domäne von p53 und inhibiert über seine intrinsische Repressorfunktion die Transaktivierung p53-regulierter Gene (zur Übersicht: White, 1996). Neueste Untersuchungen zeigen, dass diese Vorgänge über die Konjugation von SUMO-1 an E1B-55 kDa reguliert werden (Endter *et al.*, 2001). Außerdem ist E1B-55 kDa direkt an Vorgängen der Zellzyklusprogression beteiligt (Goodrum und Ornelles, 1997). Wahrscheinlich schließt diese Aktivität das zelluläre E1B-AP5-Protein mit ein, das mit E1B-55 kDa interagiert (Gabler *et al.*, 1998; Kzhyshkowska *et al.*, 2001) und vermutlich tumorsupprimierende Eigenschaften besitzt (Gabler *et al.*, 1998; Schütt, 2000).

2.2.5.2 E4-Region

Nachdem man lange Zeit das transformierende Potenzial von Adenoviren einzig auf die E1-Region zurückführte, kann nun auch der E4-Region eine wichtige Funktion im Transformationsprozess zugeteilt werden. Daten der letzten Jahre zeigen, dass die Proteine der E4-Region ein weites Spektrum an Funktionen umfassen, die für eine effiziente virale Replikation benötigt werden. Dabei agieren die E4-Proteine über ein komplexes Netzwerk aus Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Faktoren, die in Transkription, Apoptose, Zellzykluskontrolle, DNA-Reparaturmechanismen, Signalübertragung, posttranslationalen Modifikationen und der Integrität von PML *oncogenic domains* (PODs) involviert sind. Nach heutigem Kenntnisstand überlappen einige der lytischen Funktionen mit denen, welche für die onkogene Transformation primärer Säugerzellen verantwortlich sind (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001b).

Alle bisher charakterisierten humanen Adenoviren besitzen eine homologe E4-Region mit ähnlicher Sequenzorganisation. Diese befindet sich am rechten Ende des Genoms und wird am komplementären DNA-Strang abgelesen (Abb. 4).

Dargestellt ist das rechte Ende des Genoms von Adenovirus Serotyp 5. Die Detailansicht zeigt die Länge und Transkriptionsrichtung der Vorläufer-RNA sowie die Lage der offenen Leserahmen 1 bis 6/7. Die Genprodukte der Leserahmen 1, 2, 3, 4, 6 und 6/7 wurden in virusinfizierten Zellen detektiert. E4orf3/4 konnte bislang nur auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. ITR: *inverted terminal repeat*; P: E4-Promoter; cap: Startstelle der Vorläufer-RNA; Poly(A): Polyadenylierungsstelle.

In Ad5-infizierten Zellen akkumuliert die E4orf1-mRNA erst spät nach der Infektion (Dix und Leppard, 1993), was auf eine späte lytische Funktion hindeutet. Minimale Effekte von E4orf1-Mutanten auf das Viruswachstum lenkten das Interesse mehr auf die transformierende Funktion von E4orf1, da gezeigt wurde, dass das abgeleitete Genprodukt für die Ad9-vermittelte Induktion von Brusttumoren in weiblichen Ratten essenziell ist (Javier *et al.*, 1992; Javier, 1994; Javier und Shenk, 1996; Weiss *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zu E4orf1 wirkt das Ad5 E4orf4-Protein der Transformation entgegen, indem es sehr effizient über einen p53-unabhängigen Mechanismus Apoptose induzieren kann (Lavoie *et al.*, 1998; Marcellus *et al.*, 1998; Shtrichman und Kleinberger, 1998). In diesem Zusammenhang ist die beschriebene physikalische und funktionelle Wechselwirkung zwischen dem E4-Protein und der zellulären Phosphatase 2A (PP2A) von Bedeutung (Müller *et al.*, 1992; Kleinberger und Shenk, 1993). E4orf6/7 agiert als viraler Transaktivator, der die Expression viraler (E2) und zellulärer Gene über die E2F-Transkriptionsfaktoren kontrolliert (zur Übersicht: Cress und Nevins, 1996). Außerdem kann E4orf6/7 die Transformation sowohl negativ als auch positiv beeinflussen (Yamano *et al.*, 1999). Die Funktion des E4orf2-Genproduktes ist dagegen bisher noch nicht aufgeklärt (Halbert *et al.*, 1985; Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989; Dix und Leppard, 1995).

E4orf3 und E4orf6

In den letzten Jahren fanden die beiden E4-Genprodukte E4orf3 und E4orf6 zunehmende Beachtung in Bezug auf Transformation und Onkogenität. Sie modulieren die Kontrollmechanismen der Wirtszelle im produktiven Infektionszyklus auf allen Ebenen der Genexpression. Dabei zeigen beide Proteine zum Teil funktionelle Überlappungen. Jedes der Genprodukte hat voneinander unabhängige Funktionen bezüglich der viralen DNA-Replikation, der späten viralen Proteinsynthese, dem Abschalten der Wirtszell-Proteinsynthese und der Produktion von Nachkommenviren. Ebenso inhibieren sie eine Konkatemerbildung des viralen Genoms (Halbert *et al.*, 1985; Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990; Weiden und Ginsberg, 1994). Einige der redundanten Funktionen beruhen auf der Fähigkeit, mit den gleichen viralen und zellulären Faktoren zu interagieren. Sowohl E4orf3 als auch E4orf6 binden an E1B-55 kDa (Sarnow *et al.*, 1984; Rubenwolf *et al.*, 1997; Leppard und Everett, 1999; Nevels *et al.*, 1999a) und an die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), einem Schlüsselenzym in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Boyer *et al.*, 1999). Es wird diskutiert, dass die Komplexbildung mit DNA-PK die Entstehung konkatemerer, viraler Genome verhindert (Weiden und Ginsberg, 1994;

Boyer *et al.*, 1999; Nicolás *et al.*, 2000). Der E1B-55 kDa/E4orf6-Komplex reguliert den nukleozytoplasmatischen RNA-Transport, indem er den selektiven Export viraler mRNA fördert, während die meisten zellulären mRNA-Spezies im Zellkern zurückgehalten werden (zur Übersicht: Dobner und Kzhyshkowska, 2001). Ebenso wurde berichtet, dass E4orf6 im Komplex mit E1B-55 kDa ständig zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelt (Goodrum *et al.*, 1996; Dobbstein *et al.*, 1997; Krätzer *et al.*, 2000; Dosch *et al.*, 2001).

Zusätzlich zu diesen biochemischen Daten konnte mittlerweile sowohl für Ad5 E4orf6 als auch für Ad5 E4orf3 ein transformierendes und onkogenes Potenzial gezeigt werden. In Kooperation mit den Proteinen der E1-Region sind beide E4-Genprodukte in der Lage die *Focus*-Bildung von primären Rattennierenzellen zu verstärken (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Nevels *et al.*, 1999a, b). Zellen, die stabil E1A, E1B, E4orf3 und/oder E4orf6 exprimieren, besitzen viele zusätzliche Eigenschaften, die mit einer vollständigen onkogenen Transformation im Zusammenhang stehen. Diese schließen vor allem grundlegende morphologische Veränderungen und, insbesondere bezüglich E4orf6, auch ein dramatisch erhöhtes Tumorstadium in Nacktmäusen mit ein (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999a, b).

Dabei liegen den onkogenen Aktivitäten von E4orf6 unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde. Die hochgradig transformierten, E4orf6-assoziierten Phänotypen korrelieren mit einer dramatischen Reduktion der p53-Mengen. Diese korrelieren wiederum invers mit der E4orf6-Expression (Nevels *et al.*, 1999a). Anscheinend wirken E4orf6 und E1B-55 kDa kooperativ der E1A-induzierten Stabilisierung von p53 entgegen, indem p53 verstärkt dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Grand *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1998; Steegenga *et al.*, 1998; Nevels *et al.*, 1999a; Boyer und Ketner, 2000; Cathomen und Weitzman, 2000; Wienzek *et al.*, 2000). Obwohl p53 sowohl an die amino- als auch carboxyterminale Domäne des E4orf6-Proteins bindet (Querido *et al.*, 2001), ist für eine Transformation nur der Carboxyterminus von E4orf6 notwendig. Diese Effekte sind unabhängig von der p53-Stabilität, umfassen jedoch andere Interaktionen mit dem Tumorsuppressor (Dobner *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997).

Die Fähigkeit von E4orf3 Zellen onkogen zu transformieren ist im Gegensatz zu E4orf6 nicht mit der Funktion und Stabilität von p53 assoziiert. Vermutlich beruhen diese Effekte auf der Interaktion mit dem E1B-55 kDa-Protein (König *et al.*, 1999; (Leppard und Everett, 1999) und der Kolokalisation mit den PODs (2.4; Nevels *et al.*, 1999b). Es konnte jedoch bisher keine Interaktion mit dem PML-Genprodukt, dem Markerprotein der PODs, nachgewiesen werden (Nevels *et al.*, 1999b).

2.3 Vektorentwicklung

Im letzten Jahrzehnt fokusierte sich die Arbeit an humanen Adenoviren zum Großteil auf ihre Anwendung als Vektorsystem zur Behandlung von Tumor- und genetischen Erkrankungen. Aufgrund ihrer einfachen Vermehrung in Gewebekultur zu hohen Virustitern und ihres breiten Zelltropismus wurde bereits gegen Ende der siebziger Jahre die Anwendung von Adenoviren als Vektorsystem diskutiert (Yaniv, 1979). Die ersten replikationsdefekten Adenovirus-Vektoren basierten auf Deletionen der E1-Region und/oder der E3-Region (*first generation vectors*; zur Übersicht: Russell, 2000). Nachdem diese Vektoren jedoch eine erhöhte In-vivo-Toxizität aufwiesen und verstärkte Immunantwort gegen die transduzierten Zellen hervorriefen, wurden Vektoren der zweiten Generation entwickelt. Diese Vektoren zeichnen sich durch eine zusätzliche Deletion der E4-Region aus (*second generation vectors*), was zu einer Reduktion der oben genannten Effekte führen sollte. Während diese Vektoren tatsächlich eine stark verringerte Toxizität und Immunantwort hervorriefen (Gao *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Lusky *et al.*, 1998; O'Neal *et al.*, 1998; Christ *et al.*, 2000; Rafii *et al.*, 2001), gab es jedoch widersprüchliche Daten bezüglich der Persistenz des Transgens (Gao *et al.*, 1996; Armentano *et al.*, 1997; Brough *et al.*, 1997; Dedieu *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Grave *et al.*, 2000). Es folgte die Entwicklung einer dritten Generation replikationsdefekter Adenovirus-Vektoren (*third generation vectors*). Hier kann das virale Genom bis auf die invertierten und terminalen Sequenzwiederholungen (ITRs, *inverted terminal repeats*) durch Fremd-DNA (> 30 kBp) ersetzt werden (zur Übersicht: Kochanek, 1999b). Inzwischen wurden neben diesen replikationsdefekten Vektoren der ersten, zweiten und dritten Generation auch konditional replikationskompetente Virusmutanten erprobt. Dabei

handelt es sich um bedingt vermehrungsfähige Viren, die ganz oder teilweise die E1A/E1B- und E4-Transkriptionseinheiten enthalten und aufgrund genetischer Veränderungen in den Kontrollregionen und/oder kodierenden Bereichen der E1A- und E1B-Gene scheinbar selektiv in bestimmten Tumorzelltypen replizieren (zur Übersicht: Alemany *et al.*, 2000; Gómez-Navarro und Curiel, 2000). Der prominenteste Vertreter dieser Vektorgruppe ist dl1520, alias ONYX-015, eine E1B-55 kDa-defekte Virusmutante (Barker und Berk, 1987; Bischoff *et al.*, 1996). Obwohl die molekulare Grundlage für die tumorspezifische Replikation dieser E1B-attenuierten Virusmutante noch unklar ist und kontrovers diskutiert wird (zur Übersicht: Dix *et al.*, 2001), stellen ONYX-015 und davon abgeleitete onkolytische Vektoren ein neues vielversprechendes Konzept zur Behandlung von Tumorerkrankungen dar (zur Übersicht: Alemany *et al.*, 2000).

2.4 PODs

2.4.1 PODs - subzelluläre Kompartimente

Bei den als PODs (PML *oncogenic domains*) oder auch als Kr *bodies* (*Kremer bodies*), ND10 (*nuclear domain 10*) und NBs (*nuclear bodies*) benannten Strukturen handelt es sich um makromolekulare Multiproteinkomplexe, die in allen bisher kultivierten Säugerzellen detektiert wurden (Boutelle *et al.*, 1974; Ascoli und Maul, 1991; Dyck *et al.*, 1994; Koken *et al.*, 1994; Weis *et al.*, 1994; Hodges *et al.*, 1998). Sie wurden ursprünglich als Ziele von Autoimmunantikörpern bei Patienten mit primärer Gallenblasenzirrhose entdeckt (Bernstein *et al.*, 1984; Powell *et al.*, 1984; Cassani *et al.*, 1985). Typischerweise findet man 10 – 30 PODs pro Kern, die im Durchmesser zwischen 0,2 und 1 µm variieren. Ihre Anzahl, Größe und Zusammensetzung hängt vom Zelltyp, Stadium des Zellzyklus und vom Hormonstatus der Zelle ab (Doucas und Evans, 1996).

2.4.2 POD – Zusammensetzung

Eine Hauptkomponente der PODs ist das PML-Protein (PML, *promyelozytische Leukämie*), das ursprünglich als Fusionspartner von RAR α bei der Chromosomentranslokation t(15; 17) identifiziert wurde (Kakizuka *et al.*, 1991; de The *et al.*, 1991; Pandolfi *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992; Goddard *et al.*, 1992; Kastner *et al.*, 1992). Viele weitere Proteine wurden in der Zwischenzeit als Bestandteile dieser subzellulären Strukturen entdeckt (Tab. 2). Darunter befinden sich Transkriptionskoaktivatoren, Onkoproteine und auch ribosomale Proteine. PML interagiert mit einigen dieser Komponenten, wie z. B. CBP, pRB und Daxx. Eine wichtige Aufgabe kommt PML bei der Bildung und Integrität der PODs zu. So haben in PML-*knock out*-Zellen (PML^{-/-}) POD-Komponenten wie Sp100, Sp140, CBP und Daxx eine aberrante nukleäre Lokalisation (Ishov *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2000a). Ebenso scheint die Modifikation von PML mit SUMO-1 ein wichtiger Aspekt bei der Aufrechterhaltung der POD-Strukturen zu sein (Zhong *et al.*, 2000a). Während PML für die Bildung der PODs verantwortlich zu sein scheint, ist die Funktion dieser Strukturen weitgehend unbekannt. Die Heterogenität der in den PODs befindlichen Proteine, die verschiedene zelluläre Funktionen ausüben, legt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Strukturen um intranukleäre Depots handelt. Die Sequestration von zellulären Faktoren in den PODs scheint dabei eine wichtige Rolle bei einer Reihe zellulärer Vorgänge, wie der Apoptose, Zellzyklusprogression oder Differenzierung zu spielen und durch PML reguliert zu werden (Ruggero *et al.*, 2000).

BIOLOGISCHE FUNKTION	AKTIVITÄT	KOMPONENTE	INTERAKTION MIT PML
Kontrolle des Zellwachstums Tumorsuppression	Regulation der Transkription	pRb (Alcalay <i>et al.</i> , 1998)	+
		p53	+
		CBP (LaMorte <i>et al.</i> , 1998)	+
	DNA-Helicase	BLM (Ishov <i>et al.</i> , 1999; Zhong <i>et al.</i> , 1999)	nicht gezeigt
	Initiation der Translation	eIF-4E (Lai und Borden, 2000)	+
		Int-6 (Asano <i>et al.</i> , 1997)	nicht gezeigt
Apoptose	Regulation der Transkription	Daxx (Zhong <i>et al.</i> , 2000b; Ishov <i>et al.</i> , 1999; Torii <i>et al.</i> , 1999)	+
unbekannt	SUMOylierung	SUMO-1 (Zhang und Xiong, 1999; Muller <i>et al.</i> , 1998; Sternsdorf <i>et al.</i> , 1997)	+
	De-Ubiquitynylierung	HAUSP (Everett <i>et al.</i> , 1997)	nicht gezeigt
Immunantwort?	Regulation der Transkription	Sp100 (Seeler <i>et al.</i> , 1998; Lehming <i>et al.</i> , 1998)	nicht gezeigt
	unbekannt	Sp140 (Bloch <i>et al.</i> , 1996)	nicht gezeigt

Tab.2 Zelluläre, POD-assoziierte Proteine und ihre Funktionen

Die Auflistung umfasst die Hauptkomponenten der PODs und deren bisher bekannte Funktionen.
+ bedeutet eine nachgewiesene Interaktion mit PML.

2.4.3 Virus-POD-Wechselwirkung

In leukämischen Zellen von Patienten mit APL (akute promyelozytische Leukämie), welche die Translokation t(15; 17) tragen, zerstört die Expression des Fusionsproteins

PML-RAR α die strukturelle Integrität der PODs (zur Übersicht: Doucas und Evans, 1996). Diese wird ebenso durch verschiedene virale Faktoren gestört (Tab. 3). Dabei handelt es sich um Proteine der Adenoviren, Herpesviren, Hepatitisviren, Papillomaviren, des humanen Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1) und des humanen T-Zell-Leukämievirus Typ-1 (HTLV-1) (Desbois *et al.*, 1996; Doucas und Evans, 1996; Day *et al.*, 1998; Doucas und Evans, 1999). Eine Verbindung zum viralen Lebenszyklus zeigt sich darin, dass PODs sich topologisch in unmittelbarer Nähe zu den Transkriptions- und Replikationszentren verschiedener DNA-Viren befinden (zur Übersicht: Maul, 1998). So löst das humane Herpes Simplex Virus Typ-1 (HSV-1) bereits zwei Stunden nach Infektion die POD-Strukturen völlig auf. Genetische Analysen zeigen, dass das virale ICP0 (Vmw110) für diesen Effekt verantwortlich ist (Maul und Everett, 1994; Everett *et al.*, 1998). Für das humane Cytomegalievirus (HCMV) wurde eine ähnliche Aktivität dem IE1-Genprodukt zugeschrieben (Ahn und Hayward, 1997; Ahn *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 1998). Bei der lytischen Replikation des Epstein Barr Virus (EBV) kann man hingegen eine sequenzielle Zerstörung der PODs beobachten. Hierbei gehen Sp100 und Daxx sehr schnell verloren, während PML nur langsam umverteilt wird (Bell *et al.*, 2000). Weiterhin ist das EBNA5-Protein, das an der Immortalisierung von B-Zellen beteiligt ist (Mannick *et al.*, 1991; Sinclair *et al.*, 1994), in infizierten und transformierten Lymphozyten mit diesen Kernstrukturen assoziiert (Szekely *et al.*, 1996).

Infektionen mit Adenovirus Serotyp 5 führen innerhalb von sechs bis acht Stunden zu einer Relokalisation von POD-Proteinen in elongierte, fibrilläre Strukturen (Carvalho *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996). Die adenoviralen Proteine E1A und E4orf3 assoziieren mit den PODs, wobei E4orf3 für die Zerstörung dieser Strukturen ausreichend ist (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Ishov und Maul, 1996). Außerdem findet man nach einer Reorganisation der PODs auch das adenovirale E1B-55 kDa-Protein in den fibrillären Strukturen (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996). Die Tatsache, dass PODs ursächlich an der malignen Erkrankung APL beteiligt sind und zelluläre Tumorsuppressorproteine sowie virale Onkoproteine beherbergen, legt den Verdacht nahe, dass es sich dabei um neue Zielstrukturen von (virusinduzierten) Transformationsprozessen handelt.

VIRUS	ZIELPROTEINE	MECHANISMUS
Adenovirus	PML	E4orf3 zerstört die PODs (Carvalho <i>et al.</i> , 1995; Puvion-Dutilleul <i>et al.</i> , 1995).
HSV-1	PML Sp100	ICP0 relokalisiert PML und Sp100 aus den PODs und induziert ihre Degradation (Everett, 1999).
HCMV	PML	IE1 zerstört die PODs und verursacht eine reduzierte SUMO-1 Modifikation von PML (Ahn <i>et al.</i> , 1998; Muller und Dejean, 1999).
EBV	PML	EBNA5 kolokalisiert mit den PODs; BZLF1 zerstört die PODs (Szekely <i>et al.</i> , 1996; Bell <i>et al.</i> , 2000).
Papillomavirus	PML	L2 kolokalisiert mit den PODs und rekrutiert L1 und E2 (Day <i>et al.</i> , 1998).
HDV	PML	L-HDAg verändert die PODs (Bell <i>et al.</i> , 2000).
HFV	PML	Tas kolokalisiert mit den PODs (Regad <i>et al.</i> , 2001).
HTLV-1	Int-6	Tax relokalisiert das POD-assoziierte Int-6 ins Zytoplasma (Desbois <i>et al.</i> , 1996).
LCMV	PML	Das Z-Protein relokalisiert PML aus den PODs ins Zytoplasma (Borden <i>et al.</i> , 1998).

Tab. 3 Modulation der POD-Integrität durch Viren

2.5 Aufgabenstellung

Das transformierende Potenzial von Adenoviren wird traditionell der E1-Region des viralen Genoms zugeschrieben. Diese kodiert für die E1A- und E1B-Genprodukte, die durch die Interaktion mit dem Tumorsuppressorproteinen pRb und p53 kooperativ die zelluläre Transformation vermitteln. Die Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch ergeben, dass Adenoviren weitere Genprodukte besitzen, die transformierendes Potenzial besitzen. In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe erstmals zeigen, dass zwei Genprodukte der E4-Region - E4orf3 und E4orf6 - die Funktion von E1B bezüglich der Transformationsinitiation ersetzen können und in Kombination mit E1A plus E1B zur Ausbildung eines vollständig transformierten zellulären Phänotyps beitragen.

Zur weiteren Aufklärung der transformierenden Eigenschaften von E4orf3 und E4orf6 sollten im Rahmen dieser Arbeiten zunächst immunologische und immunhistochemische Analysen zur Expression und subzellulären Lokalisation der E4-Proteine in stabil E1A/E4- und E1A/E1B/E4-transformierten BRK-Zellen durchgeführt werden. Dabei sollte der Frage nachgegangen werden, in welchem Umfang das Ad5 E4orf3-Protein, analog zu virusinfizierten Zellen, eine Reorganisation der subnukleären PML Onkodomänen (PODs) in transformierten Zellen induziert. Weiterhin sollten durch In-vitro- und In-vivo-Bindungsexperimente zelluläre Interaktionspartner des Ad5 E4orf3-Proteins identifiziert werden, die möglicherweise mit der POD-Lokalisation des Ad5-Proteins in Verbindung stehen. Schließlich sollte auf der Grundlage dieser Ergebnisse durch Transformationsversuche, Mutationsanalysen und funktionellen Studien die Frage beantwortet werden, ob die Wechselwirkung mit diesen Faktoren im Zusammenhang mit den transformierenden Aktivitäten des E4orf3-Proteins steht.

3 Material

3.1 Zellen

3.1.1 Bakterienstämme

Zur Klonierung rekombinanter DNA und Amplifikation von Plasmiden wurden die *E. coli* Stämme DH5 α und DH10B verwendet. Genexpressionen wurden im Stamm TOPP™ 3 (Stratagene) durchgeführt. Bei der *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis* kamen XL1-Blue (Stratagene) zum Einsatz.

BEZEICHNUNG	GENOTYP
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169, (ϕ80dlacZΔM15), <i>hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i> (Hanahan, 1983)</i>
DH10B	<i>F'araD139, Δ(ara, leu)7697, ΔlacX174, <i>galU, galK, mcrA, Δ(mrr, <i>hsdR, mcrBC), rspL, deoR, (ϕ80dlacZΔM15), endA1, nup5, recA1</i> (Bethesda Research Laboratories)</i></i>
TOPP™ 3	<i>rif [F'proAB lacI^qZΔM15, Tn10 (<i>tet</i>)] kan^r</i> (Hatt <i>et al.</i> , 1992)
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (<i>tet</i>)]</i> (Bullock <i>et al.</i> , 1987)

3.1.2 Säugerzellen

BEZEICHNUNG	MERKMAL
H1299	Humane, p53-negative Zelllinie aus einem Lungenkarzinom (Mitsudomi <i>et al.</i> , 1992).
A549	Zellen eines humanen Lungenkarzinoms, Wildtyp p53 (Giard <i>et al.</i> , 1973).
911	Adenovirus Typ 5-transformierte, humane, embryonale Retinoblastom-zelllinie. Die E1-Region ist stabil im Genom integriert und exprimiert die adenoviralen E1A- und E1B-Genprodukte (Graham <i>et al.</i> , 1977).
BRK	Primäre Nierenzellen aus 5 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten.

BEZEICHNUNG	MERKMAL
AB7, AB16	Etablierte Rattenzelllinie mit Expression der E1-Proteine (Nevels <i>et al.</i> , 1999b).
ABS1, ABS6, ABS16	Etablierte Rattenzelllinie mit Expression der E1-Proteine sowie E4orf6 (Nevels <i>et al.</i> , 1999b).
ABT9, ABT10, ABT29	Etablierte Rattenzelllinie mit Expression der E1-Proteine sowie E4orf3 (Nevels <i>et al.</i> , 1999b).
ABST4, ABST5	Etablierte Rattenzelllinie mit Expression der E1-Proteine sowie E4orf3 und E4orf6 (Nevels <i>et al.</i> , 1999b).
AB1 - 10	Etablierte Rattenzelllinien mit Expression von E1A 12S und E1B-55 kDa (Nevels <i>et al.</i> , 2001).
AS1 - 5	Etablierte Rattenzelllinien mit E1A 12S/13S und E4orf6 transfiziert; keine Expression der adenoviralen Proteine (Nevels <i>et al.</i> , 2001).
AS6 - 10	Etablierte Rattenzelllinien mit E1A 12S und E4orf6 transfiziert; Expression von E1A in AS6, 7, 8, 10; keine Expression von E4orf6 (Nevels <i>et al.</i> , 2001).
AT1 - 4, 10	Etablierte Rattenzelllinien mit E1A 12S/13S und E4orf3 transfiziert; keine Expression der adenoviralen Proteine (Nevels <i>et al.</i> , 2001).
AT5 - 9	Etablierte Rattenzelllinien mit E1A 12S und E4orf3 transfiziert; Expression von E1A in AT5, 8, 9; keine Expression von E4orf3 (Nevels <i>et al.</i> , 2001).
RLEC	Primäre Linsenepithelzellen aus Kaninchen.
Immort. RLE	Durch Transfektion mit leerem Vektor entstandene immortalisierte Kaninchenlinsenepithelzelllinie (diese Arbeit).
RLE AB1-2	Etablierte Kaninchenlinsenepithelzelllinie mit Expression der Ad5 E1-Proteine (diese Arbeit).
RLE ABS1-5	Etablierte Kaninchenlinsenepithelzelllinie mit Expression der Ad5 E1-Proteine sowie Ad5 E4orf6 (diese Arbeit).
RLE ABS1-6	Etablierte Kaninchenlinsenepithelzelllinie mit Expression der Ad5 E1-Proteine sowie Ad5 E4orf6 (diese Arbeit).
RLE ABT2-4	Etablierte Kaninchenlinsenepithelzelllinie mit Expression der Ad5 E1-Proteine sowie Ad5 E4orf3 (diese Arbeit).

3.2 Adenoviren

Es wurde das Wildtyp-Virus des Serotyp 5 mit der Bezeichnung H5wt300 verwendet.

3.3 Nukleinsäuren

3.3.1 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden als Startermoleküle für Sequenzreaktionen, PCR-Amplifikationen und die Einführung von Mutationen durch PCR verwendet. Sie wurden von der Firma Metabion bezogen. In der ersten Spalte ist die Nummer des Oligonukleotids in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben.

#	BEZEICHNUNG	SEQUENZ	VERWENDUNG
1	E4orf6 fw	CAC GGA TCC ATG ACT ACG TCC GG	Amplifikation von E4orf6
48	E4orf6 rev	CGC GAA TTC GTC GAC GCG CGA ATA AAC TGC TGC	Amplifikation von E4orf6
252	T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC	5'-Sequenzierung
257	pGEX fw	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	5'-Sequenzierung von pGEX- Insertionen
258	pGEX rev	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG	3'-Sequenzierung von pGEX- Insertionen
330	E1A fw	CCG AAG AAA TGG CCG CCA GTC TTT TGG ACC AGC	Amplifikation von E1A
331	E1A rev	GCG TCT CAG GAT AGC AGG CGC CAT TTT AGG ACG G	Amplifikation von E1A
363	E4orf3 fw	CGC TGC TTG AGG CTG AAG GTG GAG GGC GC	Amplifikation von E4orf3
364	E4orf3 rev	CCA AAA GAT TAT CCA AAA CCT CAA AAT GAA G	Amplifikation von E4orf3
447	GG 97/98 AA fw	GAC CAC GCC ACC GCA GCA GAG CGC GTT CAC	Mutagenese von E4orf3 wt
448	GG 97/98 AA rev	GTG AAC GCG CTC TGC TGC GGT GGC GTG GTC	Mutagenese von E4orf3 wt
449	LV 88/90 AA fw	CAT TAT CTG TTC TGC CGC TGC AGA GTT TGA CCA C	Mutagenese von E4orf3 wt
450	LV 88/90 AA rev	GTG GTC AAA CTC TGC AGC GGC AGA ACA GAT AAT G	Mutagenese von E4orf3 wt

#	BEZEICHNUNG	SEQUENZ	VERWENDUNG
455	K 8 R fw	CTT GAG GCT GAG GGT GGA GGG CGC TCT G	Mutagenese von E4orf3 wt
456	K 8 R rev	CAG AGC GCC CTC CAC CCT CAG CCT CAA G	Mutagenese von E4orf3 wt
463	HP 55/56 AA fw	GTT TAT AGA GGA GAT TGC CGC CGA AGG GTT TAG C	Mutagenese von E4orf3 wt
464	HP 55/56 AA rev	GCT AAA CCC TTC GGC GGC AAT CTC CTC TAT AAA C	Mutagenese von E4orf3 wt
570	p300 A fw	CGC GGA TCC GAG TTC TCT TCA CTC CGA AGA	Amplifikation eines p300-Fragments (1640 – 1845)
571	p300 A rev	CCG GAA TTC CTG TTG CTG CCC AAC CAC ACC	Amplifikation eines p300-Fragments (1640 – 1845)
572	p300 B fw	CGC GGA TCC GTT GTG CAG CAT ACC AAG GGT	Amplifikation eines p300-Fragments (1764 – 1967)
573	p300 B rev	CCG GAA TTC CAT ACC CAT GGG GGC CAT G	Amplifikation eines p300-Fragments (1764 - 1967)
574	p300 C fw	CGC GGA TCC CCC TAC TTG CCC AGG ACT CAA	Amplifikation eines p300-Fragments (1885 - 2112)
575	p300 C rev	CCG GAA TTC CCC TGG CTG CCC CTG GGG	Amplifikation eines p300-Fragments (1885 - 2112)
576	p300 D fw	CGC GGA TCC AAC ATG GCT CCA CAA CCA GGA	Amplifikation eines p300-Fragments (2026 - 2219)
577	p300 D rev	CCG GAA TTC GTA GCC AAC TCC TTG GGG TTG	Amplifikation eines p300-Fragments (2026 - 2219)
578	p300 E fw	CGC GGA TCC CCA CCA CAG CCG CAG CAG	Amplifikation eines p300-Fragments (2220 - 2324)
579	p300 E rev	CCG GAA TTC GTG GGG GGG CTG GGA CTG	Amplifikation eines p300-Fragments (2220 - 2324)
580	p300 F fw	CGC GGA TCC CAA CAG ATG GGG TCC CCT GTT	Amplifikation eines p300-Fragments (2267 - 2414)
581	p300 F rev	CCG GAA TTC TAT GTC TAG TGT ACT CTG TGA	Amplifikation eines p300-Fragments (2267 - 2414)
582	p300 N fw	CGC GGA TCC ATG GCC GAG AAT GTG GTG GAA	Amplifikation eines p300-Fragments (1 - 435)
583	p300 N rev	CCG GAA TTC AAC GGG TGC TCC AGT CAA AAT	Amplifikation eines p300-Fragments (1 - 435)

#	BEZEICHNUNG	SEQUENZ	VERWENDUNG
586	R 3 A fw	GGA TCC GTC ATG ATT GCC TGC TTG AGG CTG	Mutagenese von E4orf3 wt
587	R 3 A rev	CAG CCT CAA GCA GGC AAT CAT GAC GGA TCC	Mutagenese von E4orf3 wt
588	L 22 A fw	CAA TGG CCG GAG CCA ATA TTC GGG ATT TG	Mutagenese von E4orf3 wt
589	L 22 A rev	CAA ATC CCG AAT ATT GGC TCC GGC CAT TG	Mutagenese von E4orf3 wt
640	E1B-55 kDa fw	GGA GCG AAG AAA CCC ATC TGA GCG GGG GGT ACC	Amplifikation von E1B-55 kDa
641	E1B-55 kDa rev	GCC AAG CAC CCC CGG CCA CAT ATT TAT CAT GC	Amplifikation von E1B-55 kDa

3.3.2 Vektoren

Folgende Vektoren wurden für Subklonierungen oder zur Transfektion als Vektorkontrolle verwendet. In der ersten Spalte angegeben ist die Nummer des Vektors in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe.

#	BEZEICHNUNG	VERWENDUNG	REFERENZ
6	pGEX-2T	Bakterieller Expressionsvektor mit GST-Anteil	Pharmacia
136	pcDNA3	Expressionsvektor für Säugerzellen, CMV-Promotor	Invitrogen
180	pRL-TK	Expressionsvektor mit Renilla-Luziferase, SV40 TK-Promotor	Promega

3.3.3 Rekombinante Plasmide

Folgende rekombinante Plasmide wurden im Rahmen der Arbeit verwendet bzw. hergestellt. In der ersten Spalte angegeben ist die Nummer des Plasmids in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe.

#	BEZEICHNUNG	VEKTOR	FREMDGEN- EXPRESSION	REFERENZ
96	pCMV-E1A 12S	pCMV _{neo}	Ad5 E1A 12S	(Bagchi <i>et al.</i> , 1990)
102	pCMV-E4orf6/7	pCMV	Ad5 E4orf6/7	(Rubenwolf <i>et al.</i> , 1997)
137	pOS E1A 12S	pOS 7	Ad5 E1A 12S	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
144	EJ-ras		ras	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
398	pGL-C3G5-luc	pGL-2 basic	fos Minimalpromotor	(Nevels <i>et al.</i> , 1997)
528	pCMV-E4orf4	pCMV	Ad5 E4orf4	(Kleinberger und Shenk, 1993)
608	pXC15	pML	Ad5 E1	(Logan und Shenk, 1984)
668	pcDNA3-E4orf3	pcDNA3	Ad5 E4orf3	(Nevels <i>et al.</i> , 1999b)
715	pcDNA3-HA E4orf6	pcDNA3	Ad5 HA E4orf6	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
728	pcDNA3-E4orf6	pcDNA3	Ad5 E4orf6	(Dobner <i>et al.</i> , 1996)
729	pcDNA3-HA E4orf3	pcDNA3	Ad5 HA E4orf3	(Täuber, 1998)
730	pcDNA3-HA Ad9 E4orf3	pcDNA3	Ad9 HA E4orf3	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
731	pcDNA3-HA Ad12 E4orf3	pcDNA3	Ad12 HA E4orf3	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
732	pcDNA3-HA Ad40 E4orf3	pcDNA3	Ad40 HA E4orf3	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
737	pE1A	pML	Ad5 E1A	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
782	pcDNA3-HA E4orf3 L13A	pcDNA3	Ad5 E4orf3 L13A	(Täuber, 1998)

#	BEZEICHNUNG	VEKTOR	FREMDGEN- EXPRESSION	REFERENZ
785	pcDNA3-HA E4orf3 L103A	pcDNA3	Ad5 E4orf3 L103A	(Täuber, 1998)
851	pCMV-E1delN	pCMV	E1Adel 2-36	(Yang <i>et al.</i> , 1996)
865	pGEX-2T-E4orf3 NΔ28	pGEX-2T	Ad5 E4orf3 NΔ28	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
880	pcDNA3-HA E4orf3 GG97/98AA	pcDNA3	Ad5 E4orf3 GG97/98AA	diese Arbeit
893	pcDNA3-HA E4orf3 NΔ28	pcDNA3	Ad5 E4orf3 NΔ28	diese Arbeit
1002	pcDNA3-p300	pcDNA3	p300	diese Arbeit
1015	pcDNA3-E1B-55k Da	pcDNA3	Ad5 E1B-55 kDa	(Moore <i>et al.</i> , 1996)
1064	pGEX-2T-p300 N	pGEX-2T	p300 N (1 – 435)	diese Arbeit
1058	pGEX-2T-p300 A	pGEX-2T	p300 A (1640 - 1845)	diese Arbeit
1059	pGEX-2T-p300 B	pGEX-2T	p300 B (1764 – 1967)	diese Arbeit
1060	pGEX-2T-p300 C	pGEX-2T	p300 C (1885 – 2112)	diese Arbeit
1061	pGEX-2T-p300 D	pGEX-2T	p300 D (2026 – 2219)	diese Arbeit
1062	pGEX-2T-p300 E	pGEX-2T	p300 E (2220 – 2324)	diese Arbeit
1063	pGEX-2T-p300 F	pGEX-2T	p300 F (2267 – 2414)	diese Arbeit
1213	pG4-p300	pG4	p300	Stammsammlung der Arbeitsgruppe

3.4 Enzyme und Reagenzien

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim und New England Biolabs bezogen.

³⁵[S]-markierte Radiochemikalien wurden von Amersham oder ICN bezogen.

3.5 Antikörper

3.5.1 Primärantikörper

BEZEICHNUNG	SPEZIFIKATION
1G11	Monoklonaler Antikörper gegen das E1B-19 kDa-Protein von Ad5 (Maus; Calbiochem).
2A6	Monoklonaler Antikörper gegen das E1B-55 kDa-Protein von Ad5 (Maus; (Sarnow <i>et al.</i> , 1982b).
3F10	Monoklonaler Antikörper gegen das HA-Epitop (Ratte; Boehringer Mannheim).
5E10	Monoklonaler Antikörper gegen das PML Protein (Maus; Stuurman <i>et al.</i> , 1992).
6A11	Monoklonaler Antikörper gegen das E4orf3-Protein von Ad5 (Ratte; Nevels, 1999).
12CA5	Monoklonaler Antikörper gegen das HA-Epitop (Maus; Boehringer Mannheim).
Anti-GST	Polyklonaler Antikörper gegen GST (Ziege; Amersham).
β-Actin (AC-15)	Monoklonaler Antikörper gegen β-Actin (Maus; Sigma).
C20	Polyklonaler Antikörper gegen ein carboxyterminales Epitop von p300 des Menschen (Kaninchen; Santa Cruz Biotechnology, Inc.).
CM-1	Polyklonaler Antikörper gegen p53 (Kaninchen; D. Lane, University of Dundee, U. K.).
DO1	Monoklonaler Antikörper gegen ein aminoterminales Epitop von p53 des Menschen (Maus; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Vojtesek <i>et al.</i> , 1992).
M73	Monoklonaler Antikörper gegen das E1A-Protein von Ad5 (Maus; Harlow <i>et al.</i> , 1985).
Pab421	Panspezifischer, monoklonaler Antikörper gegen ein carboxyterminales Epitop von p53 (Harlow <i>et al.</i> , 1981).
RSA#3	Monoklonaler Antikörper gegen den Aminoterminus des E4orf6-Proteins von Ad5 (Maus; Marton <i>et al.</i> , 1990).
RW128	Monoklonaler Antikörper gegen das p300-Protein (Maus; Richard Eckner, Universität Zürich).

3.5.2 Sekundärantikörper

Folgende Sekundärantikörper wurden für *Western Blot*-Analysen verwendet:

HRP-Anti-Maus IgG	Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper aus Schaf (Amersham Life Science).
HRP-Anti-Ratte IgG	Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper aus Ziege (Amersham Life Science).
HRP-Anti-Ziege IgG	Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper aus Kaninchen (DAKO).

Folgende Sekundärantikörper wurden für Immunfluoreszenzanalysen verwendet:

FITC-Anti-Ratte IgG (Fc γ -Fragment)	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper aus Ziege; AffiniPure gereinigtes F(ab) $_2$ -Fragment (Dianova).
FITC-Anti-Maus IgG (F(ab') $_2$ -Fragment)	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper aus Ziege; AffiniPure gereinigtes F(ab) $_2$ -Fragment (Dianova).
<i>Texas Red</i> -Anti-Ratte IgG (F(ab') $_2$ -Fragment)	<i>Texas Red</i> -gekoppelter Antikörper aus Ziege; AffiniPure gereinigtes F(ab) $_2$ -Fragment (Dianova).
<i>Texas Red</i> -Anti-Maus IgG (H + L)	<i>Texas Red</i> -gekoppelter Antikörper aus Ziege; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova).

3.6 Kommerzielle Systeme

Folgende kommerzielle Systeme wurden verwendet:

Nucleobond AX Plasmid Midi und Maxi Kit (Macherey Nagel)

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)

TNT T7-coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)

DNeasy Tissue System (Qiagen)

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)

3.7 Größen- und Molekulargewichtsstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen in Agarosegelen wurde die *1 kb DNA ladder* (Gibco BRL) verwendet.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen bei der SDS-Gelelektrophorese wurde entweder der *Broad Range Marker* (BioRad) oder der *Precision Protein Standard* (BioRad) verwendet.

3.8 Tiere

TIERE	FIRMA
Sprague-Dawley-Ratten	Charles River (Kißlegg)
NMRI(<i>nu/nu</i>)-Mäuse	Zentrale Tierlaboratorien der Universität Regensburg

3.9 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Wenn im Text nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma und Merck, Zellkulturmaterial von der Firma Falcon, Gibco BRL und Pan, sonstiges Plastikmaterial von den Firmen Falcon, Sarstedt, Greiner und Eppendorf bezogen.

3.10 Computerprogramme und Datenbanken

Texte und Tabellen dieser Arbeit wurden mit Microsoft Office 97 Professional (Microsoft) auf einem IBM-kompatiblen Personal Computer erstellt. Zeichnungen, Diagramme und Abbildungen wurden mit den Programmen Corel Draw 8.0 (Corel Systems) sowie Adobe Photoshop 5.0 (Adobe) angefertigt. Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Programm SeqEd™ 1.0.3 (Applied Biosystems). Homologie- und Motivsuchen auf Protein- und DNA-Ebene wurden mit den Programmen FASTA und BLAST aus dem Software-Paket UWGCG (Genetics

Computer Group; Devereux *et al.*, 1984) sowie mit Hilfe des BLAST-servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Biotechnology Information Center) durchgeführt. Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm BioEdit 4.8.5 erzeugt (Hall, 1999). Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe der TCS-NT Software 1.6.569 (Leica) und digitale Immunfluoreszenzbilder mit Meta View 4.6 (Universal Imaging Corporation) erstellt. Für die Literatursuche wurde die MEDLINE-Datenbank (National Library of Medicine) unter der Adresse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) herangezogen.

4 Methoden

4.1 Bakterien

4.1.1 Kulturbedingungen und Lagerung

Flüssigkulturen

Für die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur wurde steriles LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und in Gegenwart entsprechender Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 150 – 220 UpM in einem Inkubationsschüttler (New Brunswick) inkubiert. Im Bedarfsfall wurde die Bakterienkonzentration fotometrisch, bei einer Wellenlänge von 600 nm, gegen das Medium bestimmt ($1 \text{ OD}_{600} = 8 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$).

Plattenkulturen

Mit einem sterilen Zahnstocher wurden aus einer Flüssigkultur oder einer Glyzerinkultur Bakterien entnommen und auf einer Agarplatte so ausgestrichen, dass nach Übernachtinkubation Einzelkolonien isoliert werden konnten. Die so erhaltenen Plattenkulturen sind mit Parafilm verschlossen mehrere Wochen bei 4 °C haltbar.

Glyzerinkultur

Die Bakterien einer Einzelkolonie wurden in Flüssigkultur genommen und kurz vor Erreichen der stationären Phase abzentrifugiert (4000 UpM, 10 min; Rotixa 120R, Hettich). Das entstandene Sediment wurde in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert und in *CryoTubes*TM (Nunc) mit 0,5 ml sterilem Glyzerin vermischt. Die so erhaltenen Dauerkulturen sind nahezu unbegrenzt bei –80 °C haltbar.

LB-Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	• autoklavieren	

Antibiotika- Stammlösungen	Ampicillin (500 x)	50 mg/ml in H ₂ O _{bid}
	Kanamycin (200 x)	10 mg/ml in H ₂ O _{bid}
	• sterilfiltrieren	
	• bei –20 °C lagern	

4.1.2 Transformation von *E. coli* nach der Rubidiumchlorid-Methode

Die chemische Transformation von *E. coli* erfolgte modifiziert nach Hanahan (1983). Zur Herstellung von kompetenten Bakterien wurden ausgehend von einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes 5 ml TYM-Medium angeimpft und bei 37 °C über Nacht im Schüttler (New Brunswick) bei 220 UpM inkubiert. 100 ml vorgewärmtes TYM-Medium wurden mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und 15 min auf Eis gekühlt. Die Bakteriensuspension wurde auf zwei vorgekühlte 50 ml Reaktionsgefäße (Greiner) verteilt und für 15 min bei 3000 UpM und 4 °C (Rotixa 120R, Hettich) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem Tfb I resuspendiert und wiederum 10 min bei 3000 UpM und 4 °C (Rotixa 120R, Hettich) sedimentiert. Danach wurden die Bakterien vorsichtig in 20 ml eiskaltem Tfb II resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3000 UpM, 10 min und 4 °C; Rotixa 120R, Hettich) wurde das Sediment wieder in 5 ml Tfb II aufgenommen und nach Zugabe von 10 % Glyzerin in Aliquots von je 200 µl aufgeteilt. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die auf diese Weise hergestellten kompetenten Bakterien konnten für mehrere Monate bei –80 °C gelagert werden.

TYM-Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	20 g/l
	NaCl	100 mM
	MgSO ₄	10 mM
	• autoklavieren	
Tfb I	MOPS, pH 7,0	10 mM
	RbCl ₂	10 mM
	• sterilfiltrieren	

Tfb II	MOPS, pH 6,5	10 mM
	CaCl ₂	50 mM
	RbCl ₂	10 mM
	• sterilfiltrieren	

Zur Transformation wurde zunächst der Ligationsansatz bzw. die Plasmid-Lösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) zusammen mit 2 µl einer 1:10 Verdünnung von β-Mercaptoethanol in H₂O_{bid} vorgelegt und vorsichtig mit 100 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Daraufhin wurden die Bakterien 5 min auf Eis abgekühlt und danach mit 1 ml NZCYM- oder SOC-Medium versetzt. Die Bakterien wurden dann 1 h bei 37 °C im Wasserbad regeneriert, kurz abzentrifugiert und in ca. 50 µl Überstand resuspendiert. Anschließend wurde der komplette Ansatz auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

NZCYM	NZ Amin	10 g/l
	NaCl	5 g/l
	Hefeextrakt	2 g/l
	MgSO ₄ · 6 H ₂ O	2 g/l
	Casaminosäuren	1 g/l
	• pH 7,5 einstellen	
	• autoklavieren	

SOC-Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glucose	20 mM
	• autoklavieren	

4.1.3 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Sharma und Schimke (1996). 1 l YENB-Medium wurde mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,9 bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 6000 UpM und 4 °C

(Centrikon T-124, Kontron Instruments) abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde daraufhin durch Resuspension zweimal mit 100 ml eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ und einmal mit 20 ml 10 %igem Glyzerin gewaschen. Es wurde dann in einem Endvolumen von 3 ml 10 %igem Glyzerin aufgenommen, in Aliquots von je 50 μl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

YENB	Bacto Yeast Extract	7,5 g/l
	Bacto Nutrient Broth	8 g/l
	• autoklavieren	

Für die Elektroporation von Ligationsansätzen musste dieser zur Entsalzung zunächst gefällt werden. Hierfür wurden zum Ansatz 5 μg Lachssperma-DNA als *carrier*, $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gegeben. Nach 10 min Zentrifugation mit 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) bei Raumtemperatur wurde das Sediment mit $\text{EtOH}_{75\%}$ gewaschen, getrocknet und in 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ aufgenommen. Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, jeweils 50 μl der Zellsuspension mit 1 – 10 μl Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem *Gene Pulser* (BioRad) nach den Anweisungen des Herstellers bei einer Spannung von 1,25 kV, einer Kapazität von 25 μF sowie einem Parallelwiderstand von 200 Ω . Dabei wurde eine Zeitkonstante von ca. 5 ms erreicht. Alternativ wurden Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm bei einer Spannung von 2,5 kV verwendet. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort mit 1 ml SOC-Medium aus den Küvetten gespült, in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und 1 h bei 37°C bebrütet. Dann wurden sie abzentrifugiert, in ca. 50 μl Überstand resuspendiert und auf LB-Nährböden mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

4.2 DNA-Techniken

4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur analytischen Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein von Beck *et al.* modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse eingesetzt (Beck *et al.*, 1993). Die so isolierte DNA konnte für Restriktions- und Sequenzanalysen eingesetzt werden. 1,5 ml Übernachtskultur wurden bei Raumtemperatur 1 min bei 13 000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in einem Tischschüttler (Eppendorf) in 200 µl Puffer A resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit 400 µl Puffer B versetzt, vorsichtig geschwenkt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, 300 µl Puffer C zugegeben, erneut 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ebenfalls bei Raumtemperatur für 10 min bei 13 000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in 500 µl Isopropanol überführt und die DNA 10 min bei 13 000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) gefällt. Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA-Präzipitat mit 1 ml EtOH_{75 %} gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O_{bid} gelöst.

Puffer A		Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
		EDTA	10 mM
		RNAse A	100 µg/ml
		• Lagerung bei 4 °C	
Puffer B		NaOH	200 mM
		SDS	1 % (w/v)
Puffer C		Ammoniumazetat	7,5 M
		• Lagerung bei 4 °C	

Die präparative Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus 100 – 500 ml Übernachtskultur erfolgte über die Anionenaustauscher-Säulen AX 100 und AX 500 (Macherey Nagel) nach Anweisungen des Herstellers. Für die Präparation endotoxinfreier DNA kam der *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Quiagen) zum Einsatz.

4.2.2 Präparation genomischer DNA aus kultivierten Zellen

Die Präparation genomischer DNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit Hilfe des *DNeasy Tissue Systems* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

4.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe eines Spektralfotometers (Uvikon Spektralfotometer 930, Kontron) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dazu wurde die DNA-Lösung in eine Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) gegeben und ein UV-Absorptionsspektrum über den Wellenlängenbereich von 230 bis 300 nm aufgenommen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1,0 im Absorptionsmaximum bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml. Für einzelsträngige Oligonukleotide gilt die Näherungsformel $1 \text{ OD}_{260} = 20 \text{ µg/ml}$.

4.2.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Proben wurden sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke in 0,8 – 1,5 %igen Agarosegelen (w/v) elektrophoretisch aufgetrennt. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der DNA im elektrischen Feld in Abhängigkeit von der Fragmentlänge.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde eine entsprechende Menge Agarose (*Seakem® LE agarose*, FMC Bioproducts) in einem Mikrowellenherd (Moulinex) in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und zur späteren Färbung der DNA 50 ng/ml Ethidiumbromid-Stammlösung hinzugefügt. Die leicht abgekühlte Agarose-Gellösung wurde dann in eine vorbereitete Flachbettgelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden mit jeweils $\frac{1}{10}$ Vol. Auftragspuffer versetzt und auf das verfestigte Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5 – 10 V/cm. Analytische Gele wurden auf einem UV-Durchlichtschirm (Bachofer) bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und mit einem Geldokumentationssystem (Gel Print 2000i, MWG-Biotech) dokumentiert. Präparative Gele wurden zur Schonung der DNA bei langwelligem UV-Licht (365 nm) detektiert, und entsprechende DNA-Banden ausgeschnitten.

50 x TAE	Tris	2 M
	NaOAc	0,25 M
	EDTA	50 mM
	• mit Eisessig pH 7,8	
Auftragspuffer	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
	Glyzerin	50 % (v/v)
	50 x TAE	2 % (v/v)
Ethidiumbromid-Stammlösung	Ethidiumbromid	10 mg/ml
	• Lagerung bei 4 °C, lichtgeschützt	

4.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte nach einer Methode, die sich die Affinität von Nukleinsäuren an SiO_2 -Partikel in Anwesenheit eines chaotropen Salzes zunutze macht. Zur Herstellung dafür notwendiger Reagenzien siehe Boyle und Lew, 1995. Zu präparierende DNA-Banden wurden zunächst unter langwelligem UV-Licht (365 nm) mit einem Skalpell aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel ausgeschnitten. Die Agaroseblöckchen wurden anschließend in 600 µl 6 M NaI-Lösung 5 min bei 55 °C aufgelöst. Danach wurde der Ansatz mit jeweils 30 µl Glasmilch versetzt, 5 min auf Eis inkubiert (Adsorption der DNA an die Glaspartikel) und 15 s bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-haltige Glaspulver zweimal mit je 700 µl Waschpuffer gewaschen, erneut abzentrifugiert, (14000 UpM, 1 min, Raumtemperatur; Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) vom Überstand befreit und 5 min bei 55 °C getrocknet. Die DNA wurde durch Zugabe von 20 – 50 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ 5 min bei 55 °C eluiert. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) wurde der DNA-haltige Überstand vorsichtig abgezogen und dessen Konzentration über erneute Agarose-Gelelektrophorese (4.2.4) eines Aliquots abgeschätzt.

Glasmilch	Silica-Partikel, $\varnothing = 0,5 - 10 \mu\text{m}$	100 mg/ml
	NaI	3 M
	• Herstellung: siehe Boyle und Lew (1995)	
Waschpuffer	NaCl	50 mM
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	2,5 mM
	EtOH _{abs}	50 % (v/v)

4.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR-Ansatz

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*; Saiki *et al.*, 1988) ist ein Verfahren zur überexponentiellen Vermehrung (Amplifikation) definierter Nukleinsäure-Sequenzen *in vitro*.

Für einen 50 μl Standard-Reaktionsansatz wurden ca. 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt, weiterhin je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotide, 8 μl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP je 2 mM), 5 μl 10 x PCR-Puffer und 5 U thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim). Dieser Ansatz wurde in dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Biozym) in einem Thermocycler (*GeneAmp™ PCR System 9700*, Perkin Elmer) nacheinander wie folgt inkubiert:

1 min bei	95 °C	Aufschmelzen der DNA
1 min bei	55 – 70 °C	Hybridisieren der Oligonukleotide an die Zielsequenz
1 min pro kb bei	72 °C	Polymerisation

Dieser Zyklus wurde 30 mal durchlaufen, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 72 °C um 3'-Enden nicht vollendeter PCR-Produkte aufzufüllen. 5 μl der so amplifizierten DNA wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch (4.2.4) aufgetrennt und unter UV-Licht hinsichtlich Fragmentgröße und Ausbeute überprüft.

Einführen von Mutationen durch PCR

Die In-vitro-Punktmutagenese rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach den Anweisungen des Herstellers mit Hilfe komplementärer Oligonukleotide, welche die gewünschte Zielsequenz repräsentieren. Das gesamte Plasmid inklusive der Modifikation wird im Rahmen einer PCR-Reaktion folgendermaßen amplifiziert:

30 sek bei	95 °C	Aufschmelzen der DNA
1 min bei	55 °C	Hybridisieren der Oligonukleotide an die Zielsequenz
2 min pro kb bei	68 °C	Polymerisation

4.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

4.2.7.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs und Boehringer Mannheim bezogen und zusammen mit den dazu gehörigen 10 x Puffern gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Um Pufferunverträglichkeiten bei Spaltungen mit mehreren Enzymen zu umgehen, wurde die DNA gegebenenfalls nach jedem einzelnen Verdau in Isopropanol gefällt und erneut in H₂O_{bid} aufgenommen (4.1.3). Für analytische Spaltungen wurden in der Regel 0,5 – 1 µg DNA sowie je 3 – 10 U Restriktionsenzym eingesetzt und, falls nicht anders angegeben, 1 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Restriktionsspaltungen enthielten 5 - 20 µg DNA und je 50 U Enzym, bei einer Inkubation bei 37 °C für mindestens 2 h. Zu spaltende PCR-Produkte wurden nach der PCR-Reaktion zunächst über Isopropanolfällung (4.1.3) von nicht inkorporierten Oligonukleotiden und dNTPs gereinigt und konzentriert, bevor sie über Restriktionsenzymsspaltung für die Klonierung vorbereitet werden konnten. Nach der Spaltung wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (4.2.4) und gegebenenfalls aus dem Gel gereinigt (4.2.5).

4.2.7.2 Ligation und Transformation

Mit Restriktionsenzymen linearisierte Vektor-DNA wurde direkt im Anschluss an deren Spaltung mit 1 U alkalischer Phosphatase (SAP, *shrimp alkaline phosphatase*, Boehringer Mannheim) für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. DNA-Fragmente wurden vor der Ligation jeweils wie unter 4.2.5 beschrieben aufgereinigt und deren Konzentration abgeschätzt. Ein Standard-Ligationsansatz enthielt 100 ng Vektor-DNA sowie die dreifache molare Menge an zu klonierender Fremd-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim). Für die kovalente Verknüpfung der Phosphodiesterbrücken wurde der Ansatz über Nacht bei 12 °C inkubiert und anschließend zur Transformation in *E. coli* (4.1.2 oder 4.1.3) eingesetzt.

4.2.7.3 Identifikation rekombinanter Klone

Ausgehend von den transformierten *E. coli*, die auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotika wuchsen, wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher in LB-Flüssigmedium mit geeignetem Antibiotika überimpft und über Nacht bei 37 °C mit 220 UpM inkubiert. Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse (4.2.1) präpariert und in 50 µl H₂O_{bid} aufgenommen. Je 5 µl davon wurden durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen (4.2.7.1) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (4.2.4) analysiert. Die so identifizierten rekombinanten Klone wurden durch DNA-Sequenzierung (4.2.7.4) überprüft und als Glyzerinkultur (4.1.1) aufbewahrt.

4.2.7.4 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden 300 ng Plasmid-DNA und 6 pmol eines entsprechenden Oligonukleotids mit H₂O_{bid} auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt und mit 9,5 µl des Reaktionsgemisches (*Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems) versetzt. Im Anschluss wurde eine Amplifikation mit 60 Zyklen (15 s bei 96 °C, 15 s bei 55 °C und 4 min bei 60 °C)

durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden nach den Angaben des Herstellers gereinigt und in einem 7 %igen denaturierenden Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SeqEd™, Version 1.0.3 (Applied Biosystems). Die DNA-Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von Holger Melzl am Institut durchgeführt.

4.3 Protein-Techniken

4.3.1 Radioaktive Markierung durch In-vitro-Transkription/-Translation

Zur gekoppelten Transkription und Translation klonierter cDNA *in vitro* wurde das *TNT T7-coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega) nach Anweisung des Herstellers eingesetzt. Zur Markierung der Proteine wurde [³⁵S]-markiertes L-Methionin (50 µCi) zugegeben. Nach Abschluss der Reaktion wurden 5 µl des Ansatzes in SDS-Probenpuffer (4.3.5; Sambrook *et al.*, 1989) aufgenommen, 5 min bei 95 °C denaturiert und zur Überprüfung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.3.5) unterzogen. Danach wurde das Gel zur Signalverstärkung für 30 min in *Enlight* (EnerGene) inkubiert und 2 h auf Whatman™-Filtern im Vakuumtrockner (Drystar, H. Hölzel) bei 70 °C getrocknet. Anschließend erfolgte die autoradiografische Detektion der radioaktiv markierten Proteine während einer Exposition über Nacht bei –80 °C mit einem Röntgenfilm (X-OMAT™ AR, Kodak). Die Lagerung der Proben erfolgte bei –20 °C.

4.3.2 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgte als Fusion mit Glutathion S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* (Smith und Johnson, 1988). Der GST-Anteil ermöglicht eine rasche affinitätschromatographische Aufreinigung der Zielproteine. Das zu exprimierende Fremdgen stand dabei unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Dieser wird vom *lac*-Operator reguliert, an den während des normalen Bakterienwachstums das *lacI*^r-Genprodukt (*lac*-Repressor) bindet und die Transkription des Fremdgens blockiert. Durch diese Expressionskontrolle können

toxische Effekte der rekombinanten Genprodukte, die zu verringertem Zellwachstum und Instabilität der Expressionsvektoren führen, verhindert werden. Der für die Überexpression von Proteinen verwendete bakterielle Expressionsvektor pGEX-2T (Pharmacia) besitzt den *trp-lac*-Hybridpromotor *tac*, welcher ebenfalls durch den *lac*-Repressor reguliert wird. Weiterhin kodiert dieser Vektor selbst für den *lac*-Repressor, was dessen Überexpression und eine bessere Expressionskontrolle des Fremdgens zur Folge hat. Durch chemische Induktion mit dem Lactose-Analogen Isopropylthio- β -D-galactosid (IPTG) wird die Bindung des *lac*-Repressors an dessen Zielsequenz verhindert und nach dessen Dissoziation die Expression plasmidkodierter Gene induziert.

Expression

Für die Fremdproteinsynthese wurde zunächst eine Übernachtskultur in LB-Medium (4.1.1) mit entsprechenden Antibiotika 1 : 10 in vorgewärmtem Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,6 – 0,8 bei 220 UpM (New Brunswick) weiter geschüttelt. Zur Induktion wurde der Kultur 1 mM IPTG zugegeben und diese für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert.

Zellaufschluss

Die induzierte Bakterienkultur wurde zentrifugiert (6000 UpM, 10 min, 4 °C; Centrikon T-124, Kontron Instruments) und das Sediment einmal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (6000 UpM, 10 min, 4 °C; Rotixa 120R, Hettich) wurde das Sediment aus jeweils 500 ml Kulturvolumen in 10 ml NETN-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit Protease-Inhibitoren (*complete*TM, *EDTA-free*, Boehringer Mannheim) versetzt und bei –80 °C eingefroren. Den beim Auftauen in Eiswasser schon teilweise lysierten Bakterien wurde pro 10 ml Suspension 1 Spatelspitze Lysozym, 100 μ l DNase I (1 mg/ml), 130 μ l $MgCl_2$ und 13 μ l $MnCl_2$ (beides 1 M) zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Ein vollständiger Aufschluss der Bakterien erfolgte mittels dreimaliger Ultraschallbehandlung (1 min, *output* 40, 0,5 Impulse/s; Branson Sonifier 450) in einem Rosettglas auf Eis. Anschließend wurde durch Zugabe der entsprechenden Mengen an NaCl und Triton X-100 eine NaCl-Endkonzentration von 0,5 M und eine Triton X-100-

Endkonzentration von 1 % erreicht. Zur Sedimentation unlöslicher Zellfragmente wurde die Suspension dann 30 min bei 15 000 UpM und 4 °C (Centrikon T-124, Kontron Instruments) zentrifugiert.

Affinitätsreinigung

Für die Reinigung des Proteins wurde das *Bulk GST Purification Module* (Pharmacia) verwendet, das die hohe Affinität der Glutathion S-Transferase (GST) zu ihrem Substrat Glutathion ausnutzt. In diesem System können Polypeptide, die als GST-Fusionen exprimiert werden, aus bakteriellen Rohextrakten durch reversible Kopplung an Glutathion-Sepharose (*Glutathion-Sepharose*[®] 4B, Pharmacia) in einem Schritt bis zu einer Reinheit von mehr als 90 % konzentriert werden (Smith und Johnson, 1988). Das Verfahren verläuft schnell und unter milden, nicht denaturierenden Bedingungen.

Bindung an Glutathion-Sepharose

Nachdem durch Zentrifugation bereits die unlöslichen (Sediment) von den löslichen (Überstand) Zellbestandteilen abgetrennt worden waren, schloss sich als nächster Reinigungsschritt die Bindung von löslichem Protein an die Affinitätsmatrix im *Batch*-Verfahren an. Dazu wurde zunächst die gewünschte Menge an 75 %iger Glutathion-Sepharose-Suspension (etwa 0,7 ml pro 1 l Kulturvolumen) abzentrifugiert (5000 UpM, 5 min, Raumtemperatur; Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf), zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und in 0,5 M NaCl und 1 % Triton X-100 in PBS äquilibriert. Nach erneuter Zentrifugation (2000 UpM, 5 min, Rotixa 120R, Hettich) wurde die Sepharose-Matrix in 0,5 ml NETN pro 0,7 ml Ausgangsvolumen aufgenommen. Diese Suspension wurde zu dem klaren Zelllysate gegeben und für 2 h bei 4 °C auf einem Drehrotor (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert. Danach wurde das Gemisch zentrifugiert (2000 UpM, 5 min, 4 °C; Rotixa 120R, Hettich) und das Präzipitat einmal mit 5 ml 1 % Triton X-100 in PBS mit Protease-Inhibitoren (*complete*[™], *EDTA-free*, Boehringer Mannheim) gewaschen und abzentrifugiert (2000 UpM, 5 min, 4 °C; Rotixa 120R, Hettich). Nach einem weiteren Waschschrift mit 5 ml PBS und folgender Zentrifugation (2000 UpM,

5 min, 4 °C; Rotixa 120R, Hettich) wurde das Sediment in 1 ml NETN-Puffer mit 5 % Glyzerin resuspendiert und in Aliquots zu 100 µl bei -80 °C aufbewahrt.

PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	4 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	<ul style="list-style-type: none"> • pH 7,0 – 7,7 einstellen • sterilfiltrieren 	
NETN-Puffer	Tris/HCl, pH 8,0	20 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	1 mM
	NP-40	0,5 % (v/v)

4.3.3 GST-Pulldown

Der GST-Pulldown wurde genutzt, um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* zu analysieren. Dazu wurden zunächst die Mengen der an Glutathion-Sepharose gebundenen Fusionsproteine mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (4.3.5) und anschließender Färbung des Polyacrylamidgels ermittelt (4.3.6). Gleiche Mengen wurden abzentrifugiert (7000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) und einmal mit NETN-Puffer gewaschen. Danach wurde das Sediment in 300 µl NETN-Puffer resuspendiert und eine definierte Menge an radioaktiv markiertem Protein (4.3.1) zugegeben, die ebenfalls vorher mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese (4.3.5) und anschließender Autoradiografie ermittelt wurde. Dieser Ansatz wurde dann 2 h bei 4 °C auf einem Drehrotor (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert. Anschließend wurden die an die Glutathion-Sepharose gebundenen Proteine durch Zentrifugation (6500 UpM, 5 min, 4 °C; Biofuge *fresco*, Heraeus Instruments) sedimentiert, dreimal mit Dignam-Puffern (DA-Puffer) je nach Stringenz gewaschen, zentrifugiert (6500 UpM, 5 min, 4 °C; Biofuge *fresco*, Heraeus Instruments) und in 25 µl SDS-Probenpuffer (4.3.5) aufgeköcht. Die Proben wurden dann im SDS-Polyacrylamidgel (4.3.5) aufgetrennt. Danach wurde das Gel zur Signalverstärkung für 30 min in *Enlight* (EnerGene) inkubiert und 2 h auf WhatmanTM-Filtern im Vakuumtrockner (Drystar, H. Hölzel) bei 70 °C getrocknet.

Anschließend erfolgte die autoradiografische Detektion der radioaktiv markierten Proteine während einer Exposition über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einem Röntgenfilm (X-OMATTM AR, Kodak).

Dignam-Puffer (DA-Puffer X)	HEPES	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	NaCl	X mM (X= 100, 250, 500, 1000)
	• pH mit NaOH auf 7,9 einstellen	

4.3.4 Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration löslicher Proteine einer Probe wurde mit Hilfe des *Protein-Assays* (Bio Rad) bestimmt. Dieses Testverfahren, das auf der Proteinquantifizierung nach Bradford beruht (Bradford, 1976), misst die auftretende Absorptionszunahme bei 595 nm, nachdem die vorhandenen Proteine an das chromogene Substrat dieses Testsystems gebunden haben. Die Proteinkonzentration in der Probe lässt sich durch Vergleich der gemessenen OD₅₉₅ mit den Werten einer Eichkurve ermitteln. Unterschiedliche Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinprobe und 1–20 µg des Eichproteins BSA (Rinderserumalbumin, Sigma) wurden in Polystyrol-Küvetten (Sarstedt) mit PBS jeweils auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 200 µl Färbereagenz 5–30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm fotometrisch gegen den Nullwert (800 µl PBS + 200 µl Färbereagenz) bestimmt.

4.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren positive Ladung so, dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine zur Anode allein durch deren Proteingröße bestimmt wird. Nach Laemmli werden die Proteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen

Sammelgel konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das Trenngel ein (Laemmli, 1970).

Durchführung

Der Aufbau der Gelapparaturen und das Gießen der Gele erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller. Die genaue Zusammensetzung der benötigten Gellösungen sind unten aufgeführt (Harlow und Lane, 1988).

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem gleichen Volumen eines zweifach konzentrierten SDS-Probenpuffers (4.3.5; Sambrook *et al.*, 1989) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA pro Gel in TGS-Puffer bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreichte. Im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten die aufgetrennten Proteine über eine der nachfolgenden Techniken detektiert oder autoradiografisch nachgewiesen werden.

30 % Acrylamid-Stammlösung	Acrylamid	29 % (w/v)
	N, N'Methylenbisacrylamid	1 % (w/v)
Sammelgel (5 %)	Acrylamid-Stammlösung	17 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 6,8	120 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
Trenngel (8 %)	Acrylamid-Stammlösung	27 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	% (v/v)
Trenngel (12 %)	Acrylamid-Stammlösung	40 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,04 % (v/v)

Trenngel (15 %)	Acrylamid-Stammlösung	50 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	% (v/v)
TGS-Puffer	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
SDS-Probenpuffer	Tris/HCl, pH 6,8	100 mM
	SDS	4 % (w/v)
	DTT	200 mM
	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Glyzerin	20 %

4.3.6 Färbung von Polyacrylamidgelen

Für die Detektion des Gesamtproteins wurden Polyacrylamidgele nach der Elektrophorese (4.3.5) entweder mit Hilfe des kolloidalen Coomassie-Systems *Deep Blue* (EnerGene) mit einer Nachweisgrenze von 100 ng oder über das Silberfärbungs-Reagenz *Silver Surfer* (EnerGene) mit einem Detektionsvermögen von 100 pg nach den Anweisungen des Herstellers gefärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele anschließend auf WhatmanTM-Filtern 2 h im Vakuumtrockner (Drystar, H. Hölzel) bei 70 °C getrocknet und in Plastikfolie eingeschweißt.

4.3.7 Western Blot

Proteintransfer auf Nitrozellulose

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese nach Auftrennung über Polyacrylamidgele zunächst nach dem *Western Blot*-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen (Protran, Schleicher & Schuell) übertragen. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer *Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad) nach Anleitung des Herstellers in *Towbin*-Puffer bei einer Stromstärke von 400 mA für 90 min. Auf der Membran immobilisierte Proteine wurden anschließend mit Ponceau S reversibel angefärbt und die Markerbanden markiert.

Bindung des spezifischen Antikörpers

Vor der Inkubation der Nitrozellulose mit einem spezifischen Antikörper wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in PBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Die anschließende Inkubation in einer Lösung des spezifischen Antikörpers (verschiedene Verdünnungen in PBS) erfolgte ebenfalls 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach der Bindung des primären Antikörpers wurde die Membran dreimal 10 min in PBS-Tween gewaschen und danach für 1 h in einer 1 : 5000 Verdünnung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers geschüttelt. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS-Tween für je 10 min folgte die Inkubation des Nitrozellulosefilters mit dem chemolumineszenten Substrat für die HRP-vermittelte Farbreaktion.

Detektion über Enzym-Substrat vermittelte Farbreaktion

Für den spezifischen Proteinnachweis wurde das *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce) verwendet. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der verstärkten Chemilumineszenz unter Beteiligung des Enzyms HRP und stellt ein nicht radioaktives Nachweisverfahren von hoher Sensitivität dar.

In dem hier verwendeten System wird das zyklische Diacylhydrazid Luminol durch die an den anti-Immunglobulin-Antikörper gekoppelte Peroxidase unter alkalischen Bedingungen oxidiert, was zu einer Lichtemission mit einem Maximum bei 428 nm führt. Chemische Verstärker wie z.B. Phenol erhöhen die Lichtintensität um den Faktor 1000 und verlängern den Zeitraum der Emission, so dass eine maximale Intensität 5 – 20 min nach Einsetzen der Reaktion und eine anschließende Abnahme der Strahlung mit einer Halbwertszeit von 1 h zu beobachten sind.

Hierfür wurden nach Abgießen des letzten Waschpuffers die beiden Detektionslösungen 1 : 1 gemischt und in einer Menge von etwa 0,125 ml/cm² auf den Nitrozellulosefilter gegeben. Nach 5 min Inkubationszeit wurde der Nitrozellulosefilter kurz abgetropft und in Folie eingeschlagen. Die autoradiografische Detektion des Signals fand während Expositionszeiten zwischen 2 s und 20 min mit einem Röntgenfilm (X-OMAT[™] AR, Kodak) statt.

Towbin-Puffer	Tris/HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,05 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
Ponceau S	Ponceau S	0,2 % (w/v)
	Trichloressigsäure	3 % (w/v)
	Sulfosalicylsäure	3 % (w/v)
PBS-Tween	Tween-20	0,1 % (v/v)
	• in PBS	

4.3.8 Immunpräzipitation

Das Prinzip der Immunpräzipitation besteht in der spezifischen Erkennung eines Zielproteins durch einen an eine Sepharose-Matrix gekoppelten Antikörper, was eine Isolierung von Proteinen bzw. Proteinkomplexen ermöglicht. Die Kopplung von Antikörpern aus Maus und Kaninchen erfolgte an Protein A-Sepharose (Sigma). Dabei handelt es sich um Sepharose-Partikel, an die kovalent das Protein A aus *Staphylococcus aureus* gebunden ist. Für die Kopplung von Ratten-Antikörpern wurde Protein G-Sepharose (Sigma) verwendet, bei der das Protein G aus *Streptococcus sp.* an die Sepharose-Matrix gebunden ist. Diese bakteriellen Proteine binden spezifisch an den Fc-Teil von Antikörpern. Der an die Sepharose-Matrix gebundene Protein-Antikörper-Komplex kann im Anschluss daran aufgrund des hohen Molekulargewichts der Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert werden. Gebundene Proteine können daraufhin durch Erhitzen des Präzipitats auf 95 °C in einem geeigneten Probenpuffer wieder in Lösung gebracht werden und anschließend im *Western Blot* detektiert werden. Durch Koimmunpräzipitation ist es möglich, spezifische Bindungen von Proteinen an das vom Antikörper erkannte Protein nachzuweisen. Dabei ist die Stringenz des eingesetzten Lysepuffers von maßgeblicher Bedeutung.

Durchführung

Für 10 Ansätze wurden 30 mg lyophilisierte Protein A- oder G-Sepharose in 1 ml Lysepuffer (NP-40, RIPA-*light* oder RIPA) 1 h bei Raumtemperatur auf einem

Tischschüttler (Eppendorf) äquilibriert. Die Suspension wurde daraufhin bei Raumtemperatur 5 min bei 7000 UpM abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf), das Sediment in 1 ml Lysepuffer gewaschen und nach fünfminütiger Zentrifugation bei 7000 UpM und Raumtemperatur (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) entweder in 1 ml Hybridomüberstand oder in 1 ml PBS sowie 10 – 20 µg gereinigtem Antikörper aufgenommen. Die Bindung der Antikörper an die Matrix fand während einer zweistündigen Inkubation bei 4 °C auf einem Drehrotor (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) statt. Die Suspension wurde daraufhin erneut bei 7000 UpM für 5 min, 4 °C (Biofuge *fresco*, Heraeus Instruments) abzentrifugiert, die Sepharose in 1 ml Lysepuffer gewaschen, abzentrifugiert (7000 UpM, 5 min, 4 °C; Biofuge *fresco*, Heraeus Instruments) und mit Lysepuffer wieder auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Pro Ansatz wurden 100 µl dieser Suspension mit der entsprechenden Menge Zelllysate (150 – 500 µg Gesamtprotein) gemischt (4.4.4/4.3.4) und über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrotor (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert. Zur Eliminierung unspezifischer Bindungen der Proteinbestandteile aus dem Zelllysate mit der Sepharose-Matrix wurde der zu untersuchende Zellextrakt vorher mit je 100 µl der äquilibrierten Protein A- bzw. G-Sepharose für 1 h auf einem Drehrotor (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) bei 4 °C inkubiert und nach Zentrifugation (7000 UpM, 5 min, 4 °C; Biofuge *fresco*, Heraeus Instruments) eingesetzt. Die nach der Immunpräzipitation erhaltene Suspension wurde abzentrifugiert (7000 UpM, 5 min, 4 °C; Biofuge *fresco*, Heraeus Instruments), dreimal mit je 1 ml Lysepuffer gewaschen, zentrifugiert (7000 UpM, 5 min, 4 °C; Biofuge *fresco*, Heraeus Instruments) und das Sediment in 25 – 50 µl SDS-Probenpuffer (4.3.5) aufgenommen. Anschließend konnten die Proben im SDS-Polyacrylamidgel (4.3.5) aufgetrennt und weiter analysiert werden.

NP-40 (niedrige Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	0,15 % (v/v)

RIPA-light (mittlere Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	Triton X-100	0,1 % (v/v)
RIPA (hohe Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	Na- Desoxycholat	0,5 % (v/v)

4.3.9 Immunfluoreszenz

4.3.9.1 Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-*well* Schale; Falcon) auf sterilen Deckgläsern bei 37 °C kultiviert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen gegebenenfalls mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode (4.4.3.1) transfiziert und weitere 48 h inkubiert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Deckgläser wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 2 % Paraformaldehyd (in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Paraformaldehyds erfolgte die Permeabilisierung durch PBS mit 0,5 % Triton X-100. Nach einer Inkubationsdauer von 15 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen schließlich mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS) für 10 min fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. In PBS ist eine Lagerung der Zellen bei 4 °C eine Woche möglich.

Für die Immunfluoreszenz wurden die Deckgläser in Zellkulturschalen mit 12 Vertiefungen (12-*well* Schale; Falcon) überführt, kurz in PBS-Tween gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen 30 min mit je 15 µl Blockierlösung inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes und einem Waschschrift in PBS-Tween wurden pro Deckglas 15 µl Primärantikörper (geeignete Verdünnung in PBS mit 1 % BSA) zugegeben und 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann wurden die Zellen dreimal in PBS-Tween gewaschen und anschließend 30 min abgedunkelt mit

15 µl Sekundärantikörper inkubiert. Fluoreszenzgekoppelte, sekundäre Antikörper wurden als 1 : 100 Verdünnung in PBS mit 1 % BSA verwendet, wobei zur Anfärbung des Chromatins 0,5 µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid) zugesetzt wurden. Nichtgebundener zweiter Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Sämtliche Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Deckgläser wurden nun aus der 12-well Schale (Falcon) entnommen und mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger gelegt und mittels *Glow Mounting Medium* (EnerGene) eingebettet. Die Versuchsansätze konnten abgedunkelt bei 4 °C mehrere Tage bis wenige Wochen gelagert werden.

Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops (LEICA) der Klinik für Neurologie am Bezirksklinikum Regensburg oder eines institutseigenen Immunfluoreszenzmikroskops (LEICA) mit digitalem Bildverarbeitungssystem.

Blockierlösung	<i>Blocking Reagent</i> (Boehringer Mannheim)	0,5 % (w/v)
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	NaCl	150 mM
	• autoklavieren	

4.3.9.2 Fixierung mit Methanol

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden in Petrischalen auf sterilen Objektträgern bei 37 °C kultiviert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen gegebenenfalls mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode (4.4.3.1) transfiziert und weitere 48 h inkubiert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Objektträger mit PBS gewaschen und für 15 min in Methanol bei –20 °C inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen bei Raumtemperatur getrocknet und konnten bei –20 °C gelagert oder sofort für die Immunfluoreszenz verwendet werden.

Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurden die Objektträger 1 h in PBS mit 5 % Magermilchpulver inkubiert und anschließend kurz mit PBS gespült. Für die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern wurden mit Hilfe eines Diamantkratzers kreisrunde Bereiche in die Objektträger geritzt und die umgebenden Flächen

getrocknet, um ein Verlaufen der Antikörperlösungen zu verhindern. Auf die Objektträger wurde pro Färberegion 30 µl Primärantikörper in geeigneter Verdünnung in PBS mit 1 % BSA pipettiert und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert, um ein Eintrocknen der Antikörperlösung zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte auf die gleiche Weise die Inkubation mit dem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper, der als 1 : 100 Verdünnung in PBS mit 1 % BSA (Sigma) verwendet wurde. Zur Anfärbung des Chromatins wurden 0,5 µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid) zugesetzt. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit *Glow Mounting Medium* (EnerGene) überschichtet und mit einem Deckglas bedeckt. Die mikroskopische Analyse erfolgte wie in 4.3.9.1 beschrieben.

4.4 Zellkultur

4.4.1 Kulturbedingungen und Lagerung von Säugerzellen

4.4.1.1 Kultivierung von etablierten Säugerzellen als Einschichtkulturen

Adhärenente Zellen wurden als Einschichtkulturen in liegenden Polystyrolflaschen (Falcon) kultiviert. Als Nährmedium diente *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM; Gibco BRL; Dulbecco und Freeman, 1959) mit 0,11 g/l Natriumpyruvat.

Das Medium wurde mit 10 % fötalem Kälberserum (Pan) angereichert und mit 1 % einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (1000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0,9 % NaCl; Pan) versetzt. Zur Inhibition von Komplementfaktoren im fötalen Kälberserum wurde dieses vor Gebrauch bei 56 °C 30 min inaktiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator (Heraeus) mit 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert und regelmäßig mit frischem Medium versorgt. Alle 3 – 5 Tage (abhängig von der Zelldichte) wurden die Zellen im Verhältnis 1 : 4 bis 1 : 10 subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die adhärenenten Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Pan) überschichtet. Nach etwa fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur lösten sich die Zellen von der Unterlage ab und konnten in ein mit 3 - 5 ml fötalem

Kälberserum gefülltes Reaktionsgefäß (Greiner) überführt werden. Hierbei wird die Proteaseaktivität des Trypsins durch den Proteinüberschuss im Serum kompetiert und zelluläre Proteine vor weiterem Abbau geschützt. Nach Zentrifugation (2000 UpM, 3 min, 4 °C; Rotixa 120R, Hettich) wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in einem kleinen Volumen DMEM resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einem geeigneten Verhältnis auf neue Kulturflaschen verteilt, die bereits vorgewärmtes Medium enthielten.

4.4.1.2 Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen

Zur Gewinnung primärer Rattennierenzellen wurden die Nieren von 5 – 6 Tage alten *Sprague-Dawley*-Ratten unter semisterilen Bedingungen entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) mit sterilem PBS bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Nieren wurden dann unter sterilen Bedingungen mit Pinzette und Skalpell oder Schere in einer Petrischale mit PBS mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die zerkleinerten Nieren in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) mit Collagenase/Dispase (1 mg/ml; Boehringer Mannheim) überführt. Um eine vollständige enzymatische Zersetzung zu gewährleisten, wurden bis zu 20 Nieren in 20 ml PBS bei 37 °C für 3 - 4 h unter mehrmaligem Schütteln im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (2000 UpM, 10 min, 4 °C; Rotixa 120R, Hettich) von der PBS-Collagenase/Dispase-Lösung abgetrennt und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (Pan) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pan) aufgenommen und so auf Zellkulturflaschen (Falcon) verteilt, dass pro 175 cm²-Flasche die Zellen von 4 Nieren gegeben wurden. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt und die Zellen wie unter 4.4.1.1 beschrieben weiterkultiviert.

4.4.1.3 Gewinnung und Kultivierung primärer Kaninchenlinsenepithelzellen

Die Kaninchenlinsenepithelzellen stammten vom Institut für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Regensburg, wo auch die Präparation stattfand. Nach Präparation der Linse aus dem frisch enukleierten Auge wurde die vordere

Linsenkapsel am Äquator zirkulär aufgeschnitten und abgezogen. Nach dem Ausbreiten der Linsenkapsel in einer 5 cm Petrischale (Falcon) wurde sie mit einem Deckglas für histologische Präparate bedeckt und mit 3 ml Kulturmedium (DMEM, 10 % fötales Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin) überschichtet. Nach ca. 2 Wochen Kultur bei 37 °C mit 5 % CO₂ war die Zellschicht konfluent und konnte für erste Versuche verwendet werden.

4.4.1.4 Lagerung von Säugerzellen

Für die dauerhafte Lagerung von Säugerzellen wurden exponentiell wachsende Zellen nach vorheriger Ablösung durch Trypsin/EDTA (4.4.1.1) 3 min bei 2000 UpM und 4 °C (Rotixa 120R, Hettich) zentrifugiert und das Zellsediment in 1 ml fötalem Kälberserum mit 10 % DMSO (Sigma) aufgenommen und in *CryoTubes*TM (Nunc) überführt. Die Zellen wurden dann schrittweise eingefroren (2 h bei -20°C, 24 h bei -80 °C) und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen rasch bei 37 °C aufgetaut und in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Greiner) mit 10 ml vorgewärmten Medium überführt und abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min, Raumtemperatur; Rotixa 120R, Hettich), um vorhandenes DMSO zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen in frisches Medium überführt und bei 37 °C wie unter 4.4.1.1 beschrieben kultiviert.

4.4.2 Bestimmung der Gesamt-Zellzahl

Die Zelldichte wurde bei Bedarf mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert (4.4.1.1) und je nach Zelldichte verdünnt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde die Zellsuspension mit Trypanblau versetzt, wobei der Farbstoff nur in abgestorbene Zellen eindringen kann. Nachdem die Zellsuspension in die Zählkammer überführt worden war, wurden die Zellen aus 16 Kleinquadraten des kammereigenen Rasters im Lichtmikroskop ausgezählt. Durch Multiplikation mit dem Faktor 10⁴ und dem Verdünnungsfaktor erhielt man die Zellzahl pro ml Gesamtkultur.

4.4.3 Transfektion von Säugerzellen

4.4.3.1 Kalziumphosphat-Methode

Adhärenente Säugerzellen wurden nach der Kalziumphosphat-Methode (Graham und van der Eb, 1973) in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-*well* Schale; Falcon) oder Zellkulturpetrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm (Falcon) transfiziert. Die Methode beruht auf der Ausbildung von Kalziumphosphat-Kristallen, welche die zu transfizierende DNA einschließen, an der Zelloberfläche adsorbieren und phagozytiert werden.

Die Zellen wurden ausgesät und 12 – 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Dichte von 40 – 60 % hatten. Eine Stunde vor Transfektionsbeginn wurde das Medium gewechselt. Für die Transfektion einer Petrischale wurden 30 µg Gesamt-DNA in 500 µl Gesamtvolumen aus sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ und 250 mM CaCl_2 aufgenommen und in Polystyren-Reaktionsröhrchen (Falcon) unter leichtem Mischen (Vortex, 1000 UpM) langsam zu je 500 µl 2 x HeBS zugetropft. Für die Transfektion einer Zellkulturschale mit sechs Vertiefungen (6-*well* Schale; Falcon) wurden 10 µg Gesamt-DNA in 270 µl Gesamtvolumen aus sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ und 250 mM CaCl_2 aufgenommen und in Polystyren-Reaktionsröhrchen (Falcon) unter leichtem Mischen (Vortex, 1000 UpM) langsam zu je 300 µl 2 x HeBS zugetropft. Nachdem die Röhrchen für die Ausbildung des Präzipitats 20 min bei Raumtemperatur inkubiert worden waren, wurde der Inhalt auf die Zellen getropft und kurz geschwenkt. Nach 16 h im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und die transfizierten Zellen wurden je nach Versuchsansatz entsprechend weiterkultiviert.

2 x HeBS (<i>HEPES buffered saline</i>)	HEPES	11,9 g/l
	NaCl	16,4 g/l
	Na_2HPO_4	0,21 g/l
	(bzw. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	(0,26 g/l)
	<ul style="list-style-type: none"> • pH 7,05 exakt einstellen • sterilfiltrieren 	
2,5 M CaCl_2	CaCl_2	2,5 M
	<ul style="list-style-type: none"> • sterilfiltrieren 	

4.4.3.2 Liposomen-Methode

40 – 60 % konfluente, adhärenente Zellen wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-*well* Schale; Falcon) mit 3 ml Medium (DMEM, 10 % fötales Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin) kultiviert. 1 – 2 µg DNA wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) pipettiert. In ein zweites steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) wurde soviel serumfreies Medium (DMEM; Gibco BRL) vorgelegt, um mit 3 – 6 µl *Fugene*TM (Boehringer Mannheim) ein Endvolumen von 100 µl zu erhalten. Die *Fugene*TM-Lösung wurde dabei direkt in das serumfreie Medium pipettiert, ohne in Kontakt mit dem Reaktionsgefäß zu kommen, da eine mögliche Adsorption an die Plastikwand des Gefäßes oder die Lösung von Weichmachern von dessen Oberfläche die Transfektionseffizienz beeinträchtigt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die *Fugene*TM-Lösung tropfenweise auf die DNA pipettiert und nach vorsichtigem Mischen für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die *Fugene*TM-DNA-Lösung tropfenweise auf die Zellen verteilt und diese unter Standardbedingungen inkubiert. Ein Mediumwechsel ist wegen der geringen Toxizität der Liposomen nicht nötig. Nach 2 – 3 Tagen konnten die Zellen für weitere Experimente verwendet werden.

4.4.4 Ernte und Aufschluss von Säugerzellen

Für die Zellernte wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Plastiksabers (Sarstedt) vom Boden der Zellkulturschale (Falcon) abgeschabt, in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Greiner) überführt und bei Raumtemperatur 3 min bei 2000 UpM (Rotixa 120R, Hettich) zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 10 ml PBS und anschließender Zentrifugation (2000 UpM, 3 min; Rotixa 120R, Hettich). Das erhaltene Zellsediment wurde entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Die Zellen einer 10 cm-Petrischale (Falcon) wurden in einer entsprechenden Menge gekühltem Lysepuffer (4.3.8) resuspendiert und dann 30 min auf Eis gestellt. Um einen vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten, wurden die Zelllysate zweimal

mit Ultraschall (je 25 s, *output* 0,45, 0,6 Impulse/s; Branson Sonifier 450) behandelt, wobei die Reaktionsgefäße (Greiner) zwischen den Sonifikationsschritten auf Eis gelagert wurden. Größere Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (4000 UpM, 10 min, 4 °C; Rotixa 120R, Hettich) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) transferiert und für weitere Experimente verwendet.

4.4.5 Transformation primärer Zellen

Dazu wurden 3×10^6 primäre Rattennierenzellen, die, wie unter Punkt 4.4.1.2 beschrieben, 2 Tage vor Versuchsbeginn kultiviert worden waren, auf 10 cm-Petrischalen (Falcon) mit DMEM (10 % fötales Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach der Kalziumphosphat-Methode (4.4.3.1) transfiziert.

Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert (4.4.1.1) und auf jeweils drei 10 cm-Petrischalen (Falcon) ausgesät. Danach wurde jeden vierten Tag das Medium gewechselt. Nach 3 – 4 Wochen starben die meisten nicht transfizierten Zellen ab, wohingegen Zellen, in denen die adenoviralen Gene exprimiert wurden, zu Zellkolonien (*Foci*) auswuchsen. Diese konnten mit Kristallviolett-Färbelösung gefärbt und ausgezählt werden oder zur Etablierung von stabilen Zelllinien genutzt werden (4.4.6).

Kristallviolett-Färbelösung		Kristallviolett	1 % (w/v)
		Methanol	25 % (v/v)

4.4.6 Etablierung stabil transformierter Zelllinien

Die durch oben beschriebene Methode erhaltenen Zellkolonien (*Foci*) wurden entweder vereinigt (polyklonal) oder mit Hilfe von sterilen Glasringen (Nunc; Durchmesser: 5 mm) einzeln isoliert (monoklonal). Dazu wurde die Unterseite der Glasringe mit Hilfe einer Pinzette in sterile Vaseline getaucht und auf diese Weise flüssigkeitsdicht auf die zu isolierenden *Foci* gesetzt, die vorher mit PBS gewaschen worden waren. In die Glasringe wurde dann 50 µl Trypsin/EDTA-Lösung (Pan) pipettiert. Nach einigen Minuten konnten die abgelösten Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt werden, in die 100 µl fötales Kälberserum

(Pan) vorgelegt worden war. Nach anschließender Zentrifugation (5000 UpM, 3 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) wurden die Zellen in geeigneten Zellkulturschalen kultiviert und Zelllinien etabliert.

4.4.7 Mutagenese-Versuch

Zur Untersuchung eines möglichen „Hit & Run“-Mechanismus adenoviraler Proteine wurden verschiedene E1- und E4-Gene von Ad5 im HGPRT-Mutagenesetest untersucht. Dazu wurden entsprechende Expressionsplasmide durch transiente Transfektion in CHO-(*chinese hamster ovary*) D422-Zellen (Bradley und Letovanec, 1982) eingebracht, die hemizygot für das HGPRT-Gen (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen) sind und damit eine einfache phänotypische Selektion von Mutanten erlauben.

Zunächst wurden 1×10^5 CHO D422-Zellen in einem purinfreien Medium (MEM Alpha Medium; Gibco BRL) mit 10 % fötalem Kälberserum (Pan) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pan) ausgesät. Nach einer Inkubation von 48 h bei 37 °C wurden die Zellen mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode (4.4.3.1) transfiziert. Für eine effizientere Aufnahme der transfizierten Plasmid-DNA schloss sich ein sog. „Glyzerin-Schock“ an, nachdem die Zellen ca. 4 – 6 h mit der Transfektionslösung inkubiert wurden. Dabei wurde zunächst das Medium entfernt und 2 ml einer sterilen 10 %igen Glyzerinlösung auf die Zellen gegeben und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 5 ml PBS zu der Glyzerinlösung in die Schalen gegeben, leicht geschwenkt und anschließend die Lösung entfernt. Es folgten noch zwei weitere Waschschrte mit PBS, um das restliche Glyzerin zu entfernen. Abschließend wurden die Zellen mit Medium überschichtet (MEM Alpha Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin). Nach weiteren 12 – 18 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen in normalem, nicht selektivem Medium (MEM Alpha Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin) zur Manifestation von Mutationen für weitere 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abtrypsiniert (4.4.1.1) und nach Bestimmung der Gesamt-Zellzahl (4.4.2) 1×10^5 Zellen unter Selektionsbedingungen in purinfreiem Medium (MEM Alpha Medium, 10 % dialysiertes fötales Kälberserum) mit 10 µM 6-Thioguanin (2-Amino-6-Mercaptopurine; Sigma) zur

Selektion von HGPRT-Mutanten subkultiviert. Gleichzeitig wurden 1×10^2 Zellen in normalem, nicht selektivem Medium (MEM Alpha Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin) zur Bestimmung der Plattierungseffizienz als Kontrolle subkultiviert. Nach einer Inkubation von 7 – 8 Tagen bei 37 °C wurden 6-Thioguanin-resistente Klone mit Kristallviolett (4.4.5) angefärbt und die Zellkolonien ausgezählt. Ebenso wurde mit den Zellen zur Bestimmung der Plattierungseffizienz verfahren. Die Mutationshäufigkeit wurde ermittelt, indem die Anzahl der 6-Thioguanin-resistenten Kolonien mit den Kontrollplatten verglichen wurde.

4.4.8 Infektion mit Adenoviren

Für die Infektion wurden Zellen verwendet, die in 10 cm-Petrischalen subkonfluent herangewachsen waren. Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen und mit 3 ml Infektionspuffer, der 5 µl Ad5-Wildtyp-Virusstock enthielt, überschichtet. Die Zellen wurden dann 1 h bei 37 °C inkubiert und währenddessen alle 15 min vorsichtig geschwenkt, um die Virusadsorption zu gewährleisten. Anschließend wurde die Infektionslösung abgesaugt, die Zellen wurden mit 8 ml Medium bedeckt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Infektionspuffer	CaCl ₂	2 mM
	MgCl ₂	2 mM
	FKS	0,2 %
	in PBS	

4.4.9 Wachstumskurven

Zur Ermittlung des Wachstumsverhalten verschiedener Zelllinien wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) 3×10^4 Zellen pro Vertiefung in DMEM (Gibco BRL) mit 10 % fötalem Kälberserum (Pan) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pan) ausgesät. Der Zeitraum zur Erstellung der Wachstumskurven betrug 21 Tage. Die erste Zählung erfolgte 48 h nachdem die Zellen ausgesät worden waren, wobei pro Zelllinie bei jeder Messung zwei Vertiefungen ausgezählt wurden. Die Zelldichte wurde wie unter Punkt 4.4.2

beschrieben ermittelt. Die Messungen wiederholten sich alle 48 h, wobei von den jeweils verbleibenden Zellen das Medium gewechselt wurde. Die Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel bearbeitet und Wachstumskurven erstellt.

4.4.10 Morphologie

Zur Beschreibung der Morphologie wurden die entsprechenden Zellen in 10 cm-Petrischalen (Falcon) ausgesät. Nachdem diese subkonfluent angewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dann im Phasenkontrast (Leica DMR) fotografiert.

4.5 Tierversuche

4.5.1 Tumorinduktion

Die Fähigkeit transformierter Zellen zur Tumorinduktion *in vivo* wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Thilo Spruß (Zentrale Tierlaboratorien, Universität Regensburg) untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Zellen in NMRI(*nu/nu*)-Mäuse, die durch eine fehlende Thymusdrüse nicht zu T-Zell-abhängigen Abstoßungsreaktionen fähig sind, injiziert. Zunächst wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (Pan) abgelöst, abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min, Raumtemperatur; Rotixa 120R, Hettich) und zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde in einer entsprechenden Menge DMEM ohne fötalem Kälberserum resuspendiert, so dass man eine Endkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml erhielt. Von der so erhaltenen Zellsuspension wurden 1×10^6 Zellen pro Tier subkutan injiziert.

4.5.2 Bestimmung des Tumorwachstums

Die behandelten Tiere wurden in wöchentlichen Abständen auf Tumorbildung untersucht. Gegebenenfalls wurden die Tumordurchmesser bestimmt. Dazu wurde der Tumor an der Inokulationsstelle mit einem elektronischen Messgerät vermessen, wobei man die Tumorfläche [mm^2] aus zwei senkrecht aufeinander stehenden

Durchmessern, von denen der eine an der breitesten Stelle gemessen wurde, berechnet. Aus ethischen Gründen wurden die Nacktmäuse bei einer maximalen Tumorgroße von 300 mm² getötet.

4.6 Histologische Färbungen

4.6.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die entnommenen Gewebestücke wurden umgehend in Bouin'scher Lösung fixiert, bevor sie nach einer Standardmethode mit Hilfe der Histokinette in Paraffin eingebettet und aufgeblickt wurden. Von den so eingebetteten Präparaten wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Vor der jeweiligen Färbung wurden die Schnitte mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropylalkohol) entparaffiniert.

4.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H & E)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde nach der von Romeis beschriebenen Methode durchgeführt (Romeis, 1989). Dabei fanden als Farbstoffe Mayers Hämatoxylin und Eosin Verwendung. Die Übersichtsfärbung zeigt Zellkerne blau, alles andere in verschiedenen Rottönen.

4.7 Luziferase-Versuch

Zur quantitativen Bestimmung von Promotoraktivitäten wurde das *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System* (Promega) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Promotor-DNA-Fragmente sind in den Vektor pGL2-Basic vor das Luziferase-Gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* kloniert und wurden zusammen mit Expressionsplasmiden, deren Auswirkungen auf die Promotoraktivität von Interesse waren, in BRK1-Zellen transfiziert. Neben dem Substrat Luziferin benötigt die Luziferase die Cofaktoren Mg²⁺ und ATP. Gleichzeitig wurden die Zellen mit dem

mitgelieferten Vektor pRL-TK transfiziert. Das Plasmid enthält das Gen für Luziferase aus *Renilla reniformis* unter Kontrolle des konstitutiven Thymidin-Kinase-Promotors. Dieses Enzym benötigt als Substrat für eine Lichtreaktion Coelenterazin und keine weiteren Kofaktoren. Um im System variierende Parameter, wie Zellzahl, Zellyse, Transfektionseffizienz etc. zu berücksichtigen, wird zum Zellysat zunächst das Substrat Luziferin zugegeben, die Aktivität der *Photinus*-Luziferase gemessen, anschließend dessen Aktivität durch Kofaktor-Inaktivierung (EDTA, ATPasen) abgeschaltet und nach Zugabe des Substrats Coelenterazin die konstitutive Aktivität der *Renilla*-Luziferase bestimmt. Der Quotient beider Werte repräsentiert dabei die relative Aktivität der *Photinus*-Luziferase, unabhängig von variierenden Versuchsparametern.

Für die Versuche wurden 1×10^5 BRK1-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) ausgesät und am nächsten Tag mit 1 µg Reporter-Plasmid (pGL-Konstrukt), 1 µg Renilla-Plasmid (pRL-TK) sowie 10 – 100 ng Effektor-Plasmide mit der Liposomen-Methode transfiziert (4.4.3.2). Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 150 µl *passive lysis buffer* (Promega) pro Ansatz auf die Zellen gegeben und 20 min bei Raumtemperatur belassen. Durch pipettieren wurden die Zellen daraufhin vollständig abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff vollständig lysiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellfragmente bei Raumtemperatur für 5 min bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) abzentrifugiert und der Überstand konnte bei Bedarf für 2 Wochen bei -20 °C gelagert werden. Alle weiteren Arbeitsschritte zur Ermittlung der Promotoraktivität wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.1 Transformation primärer Zellen durch Proteine der E1- und E4-Region

Nachdem das transformierende Potenzial humaner Adenoviren lange Zeit den Genprodukten der frühen Region 1 (E1) zugeschrieben wurde, fand man Mitte der neunziger Jahre ein weiteres adenovirales Protein, das zur Transformation primärer Zellen beiträgt (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997). Dabei handelte es sich um E4orf6, das in der frühen Region 4 (E4) kodiert wird. In weiteren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass E1A/E1B/E4orf6-transformierte Zellen, im Vergleich zu E1A/E1B-Transformanden, zusätzliche Eigenschaften onkogen transformierter Zellen zeigen. Diese beinhalten morphologische Veränderungen, deutlich gesteigerte Wachstumsraten - auch bei niedrigen Serumkonzentrationen - sowie die Fähigkeit zur Tumorinduktion in Nacktmäusen (Nevels *et al.*, 1999a). Damit war E4orf6 das erste adenovirale Genprodukt außerhalb der E1-Region, für das ein transformierender Einfluss auf primäre Zellen gezeigt wurde. Aufgrund der Tatsache, dass ein weiteres Genprodukt der E4-Region, E4orf3, zu E4orf6 redundante Funktionen bei der lytischen Infektion besitzt, überprüfte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit das E4orf3-Protein in Transformationsversuchen auf mögliche onkogene Eigenschaften. Diese Versuche zeigten, dass E4orf3 ebenso wie E4orf6 deutlich die Anzahl stabil transformierter *Foci* in Kooperation mit E1A und E1A/E1B steigert (Täuber, 1998; Nevels *et al.*, 1999b). Die gleichzeitige Transfektion der E4-Plasmide mit E1A und E1B führt zu einer weiteren Erhöhung der *Focus*-Bildung, während in Kombination mit E1A alleine kein additiver Effekt der beiden E4-Gene beobachtet wird. Die aus den *Foci* etablierten Zelllinien zeigen ebenfalls deutliche Veränderungen hinsichtlich der Zellmorphologie, des Wachstums unter reduzierten Serumkonzentrationen und einer gesteigerten Tumorinduktion in Nacktmäusen, die jedoch schwächer ausgeprägt sind als bei den E1A/E1B/E4orf6-etablierten

Zelllinien. Somit ist E4orf3 das zweite Genprodukt der E4-Region mit onkogenem Potenzial.

5.1.1 Nachweis der E1- und E4-Proteine in etablierten Zelllinien

Die Analysen der während der Diplomarbeit etablierten Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit fortgeführt. Dabei wurden ausgewählte BRK-Zelllinien in Bezug auf die Expression der adenoviralen Genprodukte untersucht. Für die Zelllinien wurde, basierend auf den ursprünglich transfizierten Plasmiden folgende Nomenklatur verwendet: A für transfiziertes E1A, B für E1B, S für E4orf6 (six) und T für E4orf3 (three). Zum Nachweis der E1-Genprodukte wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Die Detektion der E4-Genprodukte erfolgte mittels Immunpräzipitations- und *Western Blot*-Analysen (4.3.8/4.3.7; Abb. 5).

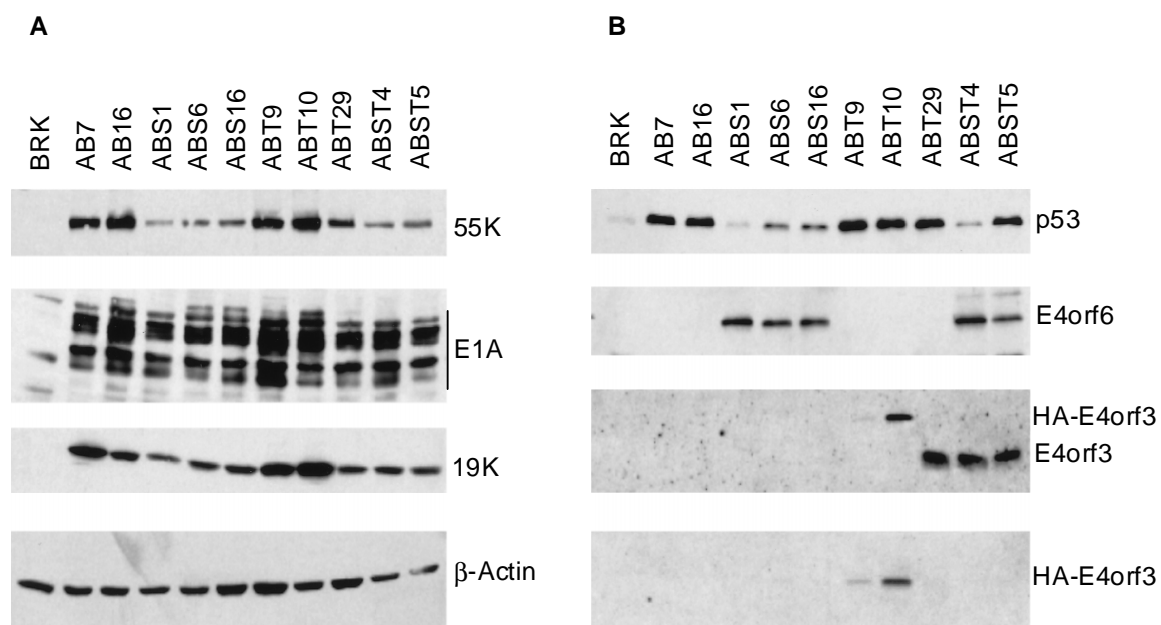


Abb. 5 Nachweis adenoviraler Proteine und p53 in BRK-Zelllinien

(A) *Western Blot*-Analyse der E1-Genprodukte. Je 50 μ g Gesamtzellextrakt wurden über 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte mit den für die Proteine spezifischen Antikörpern: anti-E1B-55 kDa 2A6; anti-E1A M73; anti-E1B-19 kDa 1G11. Das quantitative Beladen der Gele wurde mit dem Nachweis des zellulären β -Actin-Proteins (anti- β -Actin AC-15) überprüft. (B) Immunpräzipitationsanalyse der E4-Genprodukte und des zellulären p53-Proteins. 150 μ g Gesamtzellextrakt wurden in der Immunpräzipitation mit folgenden Antikörpern verwendet: anti-p53 Pab421; anti-E4orf6 RSA#3; anti-E4orf3 6A11; anti-HA 12CA5. Die Präzipitate wurden über 10 bzw. 15 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis von p53 erfolgte mit Hilfe des Antikörpers CM-1, E4orf6 mit RSA#3, natives E4orf3 bzw. HA-E4orf3 mit 6A11 sowie HA-E4orf3 mit dem spezifischen HA-Antikörper 12CA5.

In allen getesteten Zelllinien konnten die E1-Genprodukte in großen Mengen nachgewiesen werden. Ebenso konnte die Expression der E4-Genprodukte in den entsprechenden ABT-, ABS- und ABST-Zelllinien gezeigt werden. Zusätzlich wurden die Gleichgewichtsmengen des Tumorsuppressors p53 überprüft. Dabei wurden in E1A/E1B-exprimierenden Zellen große Mengen des Tumorsuppressors nachgewiesen. Grund dafür ist die durch E1A induzierte metabolische Stabilisierung von p53, die gleichzeitig durch die Anwesenheit der E1B-Genprodukte erhöht wird (Zantema *et al.*, 1985; Lowe und Ruley, 1993). Dagegen zeichneten sich ABS-Zelllinien durch drastisch reduzierte p53-Spiegel aus, wobei ein Vergleich verschiedener ABS-Zelllinien ergab, dass die E4orf6-Expression invers mit den p53-Gleichgewichtsmengen korreliert war. Dies ist auf eine E1B-55 kDa/E4orf6-induzierte Destabilisierung von p53 zurückzuführen (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998; Nevels *et al.*, 2000). In E4orf3-exprimierenden Zelllinien wurden zu AB-Zellen vergleichbare Mengen an p53 gefunden, was vermuten lässt, dass E4orf3 die Gleichgewichtsmengen von p53 nicht reduziert. Somit liegt dem onkogenen Potenzial von E4orf3 wahrscheinlich ein anderer Mechanismus zugrunde, der im Gegensatz zu E4orf6 nicht über p53 verläuft. Aufgrund früherer Beobachtungen in unserer Arbeitsgruppe, dass in E1A/E4orf6-etablierten Zelllinien keine Expression der viralen Gene nachgewiesen werden konnte (Nevels *et al.*, 1997), wurden mehrere AS- und auch AT-Zelllinien bezüglich ihrer Expression der adenoviralen Proteine getestet. Zur Kontrolle wurden neben den AT- und AS-Zelllinien noch AB-Zelllinien getestet, für die eine Expression der adenoviralen Proteine bereits gezeigt wurde. Der Nachweis erfolgte sowohl über *Western Blot*-Analyse (4.3.7) als auch mit Hilfe von Immunpräzipitationsstudien (4.3.8; Abb. 6).

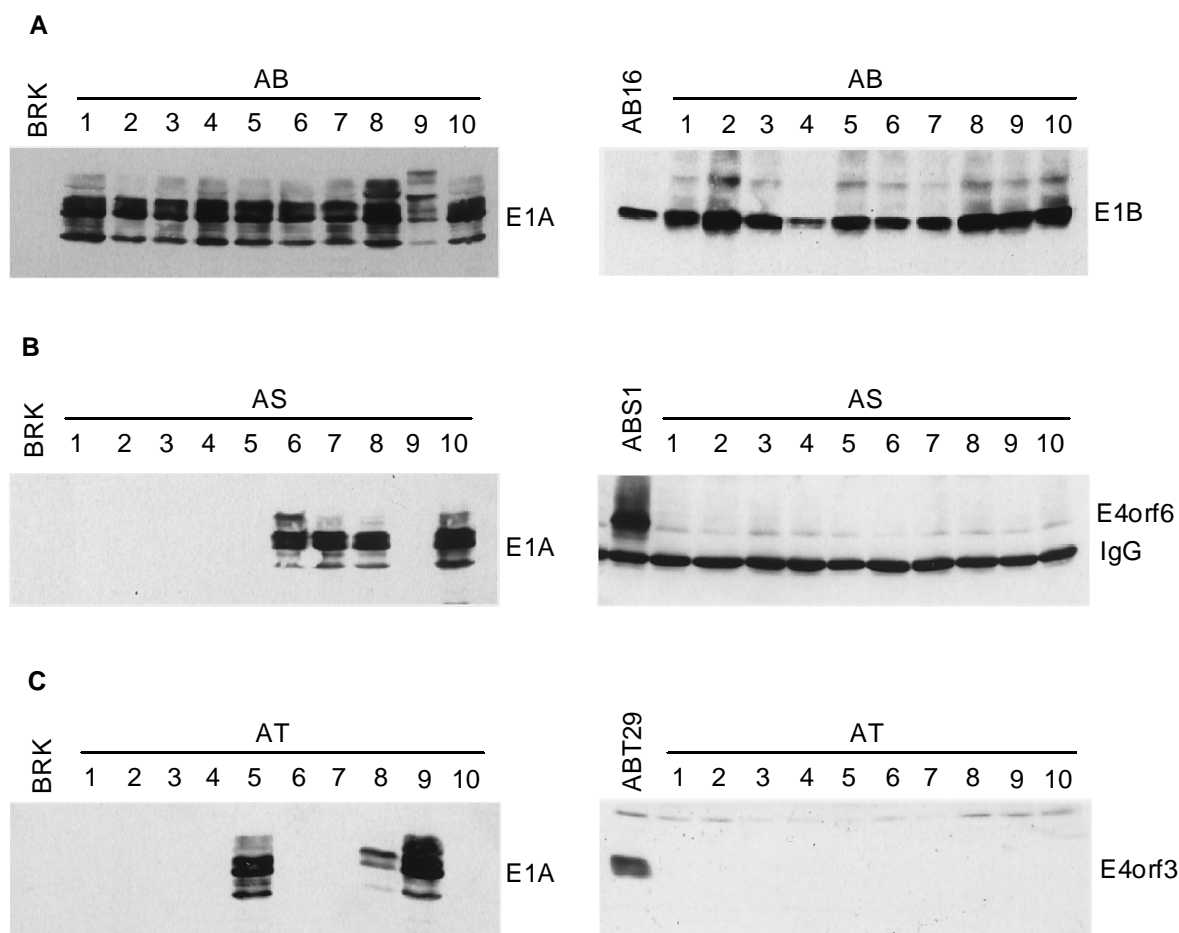


Abb. 6 Nachweis adenoviraler Proteine in AB-, AS- und AT-Zellen

Zehn verschiedene AB-, AS- und AT-Zelllinien wurden bezüglich der Expression der viralen Onkogene untersucht. (A) Für den Nachweis von E1A und E1B-55 kDa wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein über ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Expression der E1A- und E1B-Proteine wurde mit dem E1A-spezifischen M73-Antikörper und dem E1B-55 kDa-spezifischen 2A6-Antikörper nachgewiesen.

(B und C) Für den Nachweis der E4orf3- und E4orf6-Proteine wurden Immunpräzipitationen mit anschließender *Western Blot*-Analyse durchgeführt. Es wurden jeweils 150 µg Gesamtprotein in die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Präzipitation erfolgte mit dem E4orf3-spezifischen Antikörper 6A11 und dem E4orf6-spezifischen Antikörper RSA#3. Die Präzipitate wurden über 10 %ige (E4orf6) und 15 %ige (E4orf3) SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und die Proteine anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Die E4-Genprodukte wurden mit den Antikörpern 6A11 (E4orf3) und RSA#3 (E4orf6) detektiert. Der Nachweis von E1A erfolgte wie unter (A) beschrieben.

Tatsächlich konnte im Gegensatz zu den AB-, ABS- und ABT-Zelllinien, in denen ein deutliches Signal sowohl für E1A als auch für E1B zu beobachten war, nur in wenigen AT- bzw. AS-Zelllinien E1A detektiert werden. Ebenso konnte im Unterschied zu den ABS- und ABT-Zelllinien kein Nachweis für die Expression der E4-Proteine in den AT- und AS-Zelllinien erbracht werden. Diese Ergebnisse

bestätigen frühere Beobachtungen und führten zu weiteren Untersuchungen im Hinblick auf die Anwesenheit viraler DNA-Sequenzen.

5.1.2 Nachweis viraler DNA-Sequenzen in etablierten Zelllinien

Um der Vermutung nachzugehen, ob eine fehlende Expression der adenoviralen Genprodukte E1A, E4orf3 und E4orf6 in den AT- und AS-Zelllinien mit dem Verlust der kodierenden DNA-Sequenzen einhergeht, wurden die Zelllinien mittels PCR auf die Anwesenheit der DNA-Sequenzen überprüft. Dazu wurde die DNA zunächst mit Hilfe des *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen) aus den Zellen isoliert (4.2.2) und dann mit den entsprechenden Startermolekülen (3.3.1) in die PCR-Reaktionen eingesetzt (4.2.6; Abb. 7).

Die PCR-Analysen ergaben, dass die Zelllinien, die keine E1A-Expression zeigten, auch keine E1A-kodierende DNA enthielten. Weiterhin konnte bis auf wenige Ausnahmen keine E4-kodierende DNA nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden PCR-Analysen von AB-, ABS- und ABT-Zelllinien gemacht. Im Gegensatz zu den untersuchten AT- und AS-Zelllinien waren in sämtlichen AB-, ABS- und ABT-Zelllinien sowohl die kodierenden Sequenzen für E1A als auch die der E4-Genprodukte nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die E1A- und E4-kodierenden Sequenzen in transformierten Zellen nur dann erhalten bleiben und exprimiert werden, wenn E1B koexprimiert wird.

Zusätzlich wurde in Nacktmausversuchen gezeigt, dass einige der AT- und AS-Zelllinien in der Lage sind, ein Tumorstadium in den Versuchstieren zu induzieren (Nevels *et al.*, 2001). Folglich ist die transiente Expression der E4orf3- und E4orf6-Genprodukte in Kooperation mit E1A für die onkogene Transformation primärer Zellen ausreichend. Diese Befunde sprechen daher für ein „*Hit & Run*“-Szenario virusvermittelter Onkogenese.

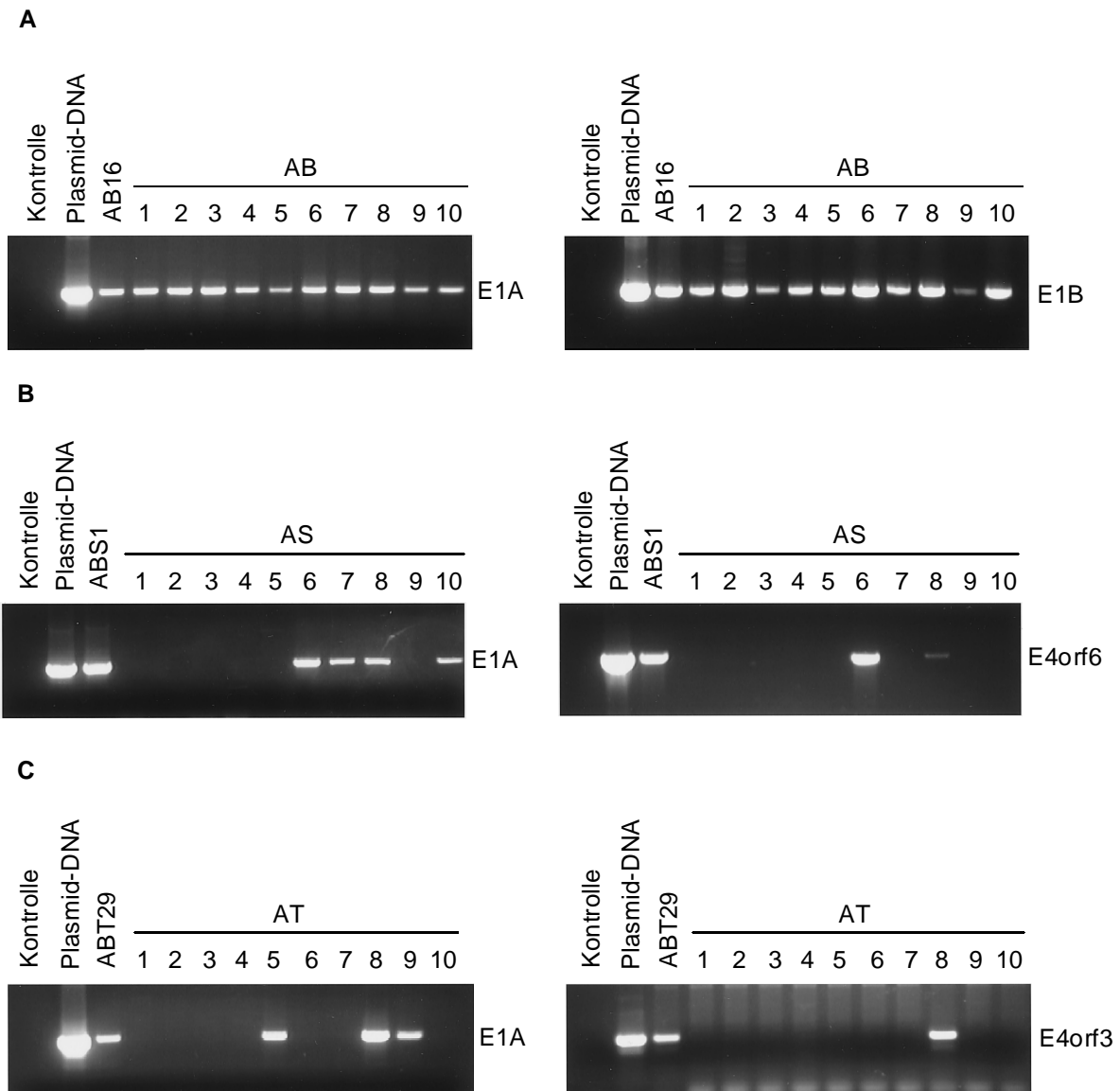


Abb. 7 Nachweis von E1A-, E1B-, E4orf6- und E4orf3-spezifischer DNA in AB-, AS- und AT-Zellen

Anhand eines PCR-Screenings wurde der Nachweis viraler DNA-Sequenzen erbracht. Für die Reaktionen wurden 500 ng genomische DNA oder 50 ng Plasmid-DNA sowie E1A-, E1B-, E4orf3- und E4orf6-spezifische Primer eingesetzt. Zusätzlich wurde zur Kontrolle noch ein Ansatz mit H₂O durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben über ein 1 %iges Agarosegel.

5.2 E1A/E4-vermittelte „Hit & Run“-Transformation

Entsprechend dem klassischen Konzept der viralen Onkogenese ist die Persistenz der virusspezifischen Onkogene für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps erforderlich. Im Gegensatz dazu steht die Hypothese eines sog.

„Hit & Run“-Mechanismus, bei dem virale Onkogene für die Initiation („Hit“), nicht aber für die Aufrechterhaltung des transformierten Zustands notwendig sind („Run“; Skinner, 1976; Schlehofer und Hausen, 1982; Galloway und McDougall, 1983). Dieser Hypothese liegen Beobachtungen zugrunde, dass bei einigen Herpesviren (Gelb und Dohner, 1984; Karran *et al.*, 1990; Jox *et al.*, 1997; Legrand *et al.*, 1997), Papovaviren (Iwasaka *et al.*, 1992) und SV40 (Inozemtseva *et al.*, 1997) eine kontinuierliche Expression der viralen Proteine für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps nicht notwendig ist und dass in den transformierten Zellen nie konsistent die viralen DNA-Sequenzen nachgewiesen werden konnten (Skinner, 1976; Galloway und McDougall, 1983; Mushinski *et al.*, 1983; zur Übersicht: zur Hausen, 1996b). Als weiterer Hinweis für die „Hit & Run“-Hypothese der virusvermittelten Transformation gilt die Tatsache, dass Infektionen mit Herpes-Simplex-Virus (HSV-1 und HSV-2), dem murinen Abelson-Leukämie-Virus (ALV) und Adenovirus Typ 12 chromosomale Aberrationen und andere Mutationen im Wirtsgenom verursachen (zur Hausen, 1967; Waubke *et al.*, 1968; Kuhlmann *et al.*, 1982; Schlehofer und zur Hausen, 1982; Mushinski *et al.*, 1983). Es wurde deshalb postuliert, dass die vorübergehende Expression und/oder Integration bestimmter viraler Gene ausreicht, um Mutationen zu induzieren („Hit“), die zur zellulären Transformation führen. Die Manifestierung des transformierten Phänotyps auf genetischer Ebene ist dann mit dem Verlust der viralen Erbinformation kompatibel („Run“).

5.2.1 Bestimmung des mutagenen Potenzials von E4orf3 und E4orf6

Zur Untersuchung der mutagenen Eigenschaften von DNA-Viren in Säugerzellen wurde ein genetisches System verwendet, das die Bestimmung von Mutationshäufigkeiten am X-chromosomalen HGPRT-(Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) Genlokus ermöglicht (zur Übersicht: Stout und Caskey, 1985). Dieses Enzym besitzt eine wichtige Funktion beim Wiederverwertungsweg der Purinbiosynthese, ist aber für die Lebensfähigkeit der Zelle nicht unbedingt erforderlich. Bietet man normalen Zellen 6-Thioguanin (2-Amino-6-Mercaptopurin) an, verursacht eine HGPRT-abhängige Konvertierung dieses Purinanalogons zum toxischen Nukleotid den Zelltod. Zellen mit Mutationen im HGPRT-Gen, die zum

Verlust der Enzymaktivität führen, können dagegen überleben und Kolonien bilden. Die Anzahl der Kolonien entspricht der Mutationshäufigkeit am HGPRT-Lokus, die wiederum als Maß für das mutagene Potenzial des untersuchten Agens (z. B. eines viralen Proteins) dienen kann. Um der Vermutung nachzugehen, ob E4orf3 und E4orf6 mutagenes Potenzial besitzen, wurden HGPRT-Tests (4.4.7) durchgeführt (Abb. 8).

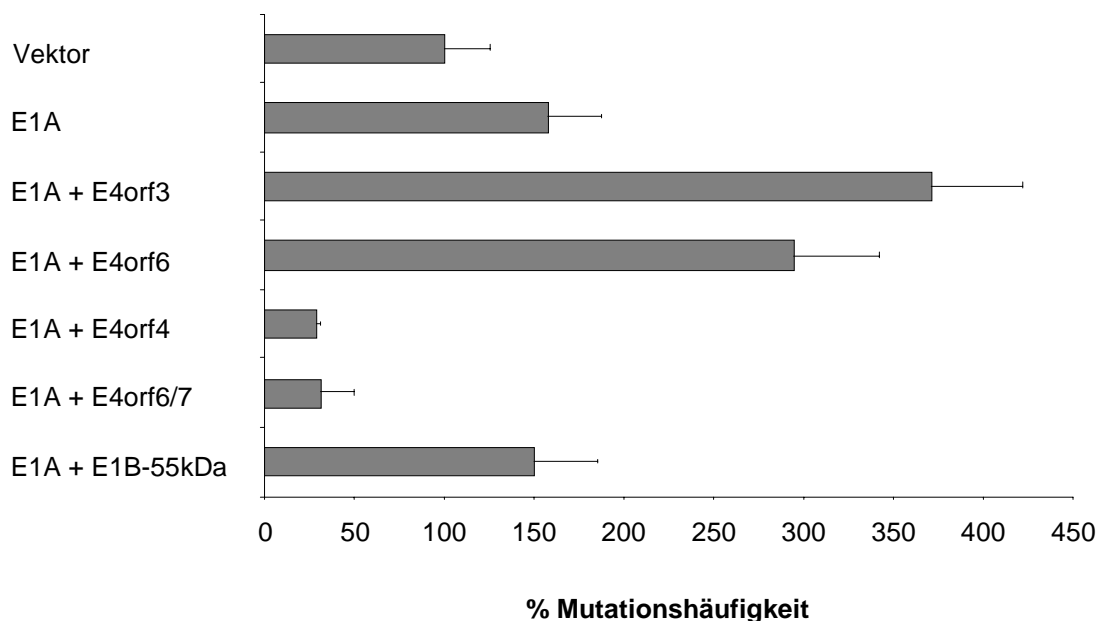


Abb. 8 Mutagenes Potenzial verschiedener E4-Genprodukte

1×10^5 CHO-D422-Zellen wurden mit je $1,5 \mu\text{g}$ pCMV-E1A, $1,0 \mu\text{g}$ pcDNA3 und je $1,0 \mu\text{g}$ eines der Plasmide pcDNA3-E4orf3, pcDNA3-E4orf6, pCMV-E4orf4, pCMV-E4orf6/7, pcDNA3-E1B-55 kDa nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Der Ansatz mit der Vektorkontrolle enthielt $2,0 \mu\text{g}$ pcDNA3. Nach vier Tagen wurden die Zellen trypsiniert und mit einer Dichte von je 1×10^5 Zellen pro Platte in Selektivmedium mit 6-Thioguanin ausplattiert. Nach 7 – 8 Tagen wurden die resistenten Kolonien aus insgesamt 2×10^5 Zellen pro Ansatz nach dem Färben mit Kristallviolett ausgezählt. Die Mutationshäufigkeiten wurden, unter Berücksichtigung der Plattierungseffizienzen, relativ zur Vektorkontrolle berechnet, die auf 100 % gesetzt wurde. Sie sind als Mittelwerte mit Standardfehlern für jeweils drei unabhängige Versuche dargestellt. Die durchschnittliche Anzahl resistenter Kolonien für die Vektorkontrolle war sieben.

Die Untersuchungen zeigten, dass die transiente Expression von Ad5 E1A die Mutationshäufigkeit im HGPRT-Gen leicht erhöht, während die isolierte Transfektion von Ad5 E4orf3 und Ad5 E4orf6 keine mutagenen Effekte verursachten (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu E1A alleine resultierte eine Kotransfektion von

E1A mit E4orf3 oder E4orf6 in einer signifikanten Erhöhung der Anzahl resistenter Kolonien, was auf mutagene Eigenschaften der beiden E4-Proteine in Verbindung mit E1A hindeutet. Um die Spezifität dieser Ergebnisse zu prüfen wurden zwei weitere E4-Proteine getestet (E4orf4 und E4orf6/7), die keine *Focus*-Bildung in Kombination mit E1A induzieren können (Nevels *et al.*, 1997, unveröffentlichte Daten). Wie erwartet, verstärkte weder E4orf4 noch E4orf6/7 die Mutationshäufigkeit. Im Gegensatz dazu wurde eine Reduktion der 6-Thioguanin-resistenten Kolonien beobachtet, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Fähigkeit beider E4-Proteine steht, Apoptose zu induzieren (Lavoie *et al.*, 1998; Shtrichman und Kleinberger, 1998; Yamano *et al.*, 1999). Ähnliche Ergebnisse wurden bei gleichzeitiger Transfektion von E1A mit E1B-55 kDa erzielt, bei der kein Anstieg der Mutationshäufigkeit am HGPRT-Lokus beobachtet werden konnte. Das gleiche Ergebnis wurde bei zwei weiteren, voneinander unabhängigen Versuchen erzielt, bei denen eine Gesamtzellzahl von 1×10^6 Zellen (10 Platten mit je 1×10^5 Zellen) in Selektivmedium ausplattiert wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Experimente zeigen eindeutig, dass die E4-Genprodukte E4orf3 und E4orf6 mutagene Eigenschaften besitzen, die in ursächlichem Zusammenhang mit ihrer Fähigkeit zur „*Hit & Run*“-Transformation stehen könnten. Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, dass sich die E1A/E4-vermittelte Transformation grundlegend vom klassischen Weg der E1A/E1B-vermittelten Transformation unterscheidet. Während beim klassischen Konzept der viralen Onkogenese die viralen Gene in den Zellen persistieren, ist bei der „*Hit & Run*“-Transformation eine transiente Expression der E1A- und E4-Genprodukte ausreichend. Somit findet eine stabile Expression der E4-Genprodukte nur in Anwesenheit von E1B statt. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Studien, die zeigten, dass in Adenovirus-transformierten Zellen E4-spezifische mRNAs nur in Verbindung mit E1A und E1B, jedoch nie mit E1A alleine detektiert wurden (Flint *et al.*, 1975; Sharp *et al.*, 1975; Flint und Sharp, 1976; Esche, 1982).

5.3 Analysen zum transformierenden Potenzial des Ad5 E4orf3-Proteins

5.3.1 Interaktion von E4orf3 mit den POD-Strukturen

Die Fähigkeit von E4orf3, das onkogene Zellwachstum zu fördern, ist im Gegensatz zu E4orf6 nicht mit der Funktion und Stabilität von p53 assoziiert (5.1). Dagegen konnten wir zeigen, dass E4orf3 ebenso wie E4orf6 in transformierten Rattenzellen an E1B-55 kDa bindet (Nevels *et al.*, 1999b). Somit könnte diese Interaktion die Aktivitäten von E4orf3 modulieren. Außerdem interagiert E4orf3 direkt oder indirekt mit zellulären Faktoren, die Komponenten von matrixassoziierten Multiproteinkomplexen, den sog. PODs (PML *oncogenic domains*) sind (2.4). Dies zeigen Beobachtungen, bei denen durch Infektion mit Wildtyp-Adenoviren eine Reorganisation dieser punktförmigen, PML-beinhaltenden Kompartimente in elongierte, fibrilläre Strukturen (*nuclear tracks* oder *spicules*) erfolgt (Abb. 9; Carvalho *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996).

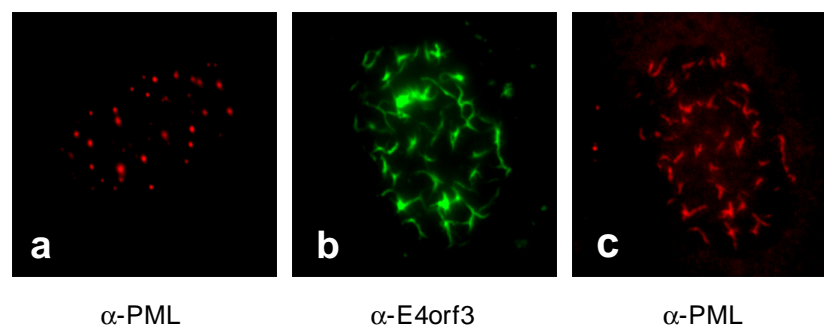


Abb. 9 Reorganisation von PODs nach Adenovirus-Infektion

A549-Zellen, die zuvor auf Objektträger ausgesät worden waren, wurden bei einer Konfluenz von 70 % mit Wildtyp-Adenovirus infiziert und nach 24 h mit Methanol fixiert. (a) Eine nicht infizierte A549-Zelle, die mit dem PML-spezifischen Antikörper 5E10 (1 : 10) inkubiert wurde. Die Detektion von 5E10 erfolgte mit einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. Zu sehen sind PODs in ihrer normalen, punktförmigen Struktur. (b, c) Eine infizierte A549-Zelle, die mit dem E4orf3-spezifischen Antikörper 6A11 (1 : 10) (b) und dem PML-spezifischen Antikörper 5E10 (1 : 10) (c) inkubiert wurde. Die Detektion von 6A11 erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper, die von 5E10 mit einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. Zu sehen ist die Lokalisation von E4orf3 in fibrillären Strukturen (b) und die mit der Infektion einhergehende Reorganisation der PODs (c). Die Aufnahmen wurden mit einer 1000-fachen Vergrößerung gemacht.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass E4orf3 auch in transformierten Zellen mit PML in diskreten, morphologisch veränderten Strukturen kolokalisiert (Abb. 10; Nevels *et al.*, 1999b).

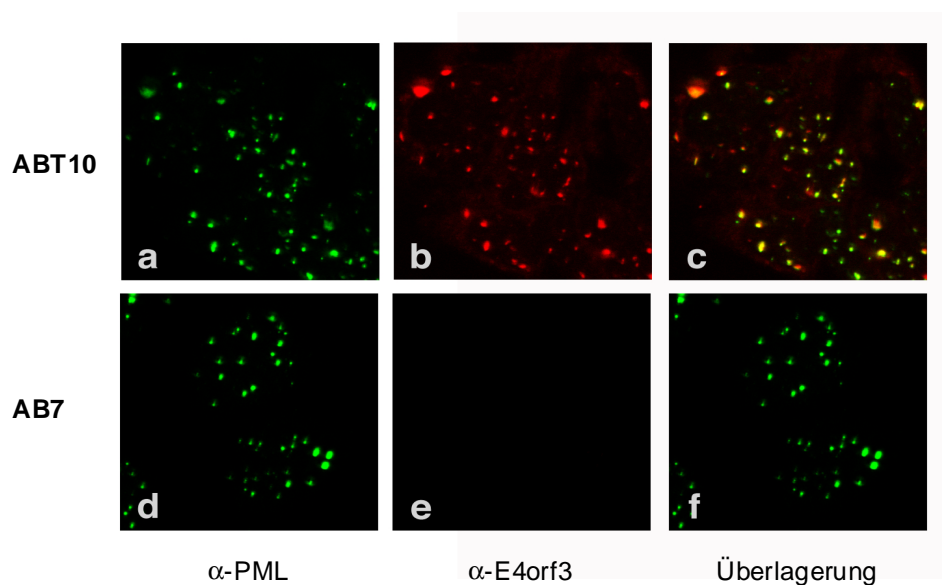


Abb. 10 Kolokalisation von E4orf3 mit PML in den PODs

ABT10- und AB7-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Dichte von ca. 80 % mit Paraformaldehyd fixiert. Anschließend folgte eine Doppelfärbung der Zellen mit dem anti-E4orf3-Antikörper 6A11 (1 : 10) und dem anti-PML-Antikörper 5E10 (1 : 10). Der Nachweis von E4orf3 erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper, der Nachweis von PML mit einem Texas Red-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. (a, d) Lokalisation von PML. (b) Lokalisation von E4orf3. (e) Kein Signal für E4orf3 in AB7-Zellen, die kein E4orf3 exprimieren. (c, f) Die Überlagerung der beiden Kanäle zeigt bei ABT10-Zellen aufgrund der Gelbfärbung eine Kolokalisation von E4orf3 und PML. Die Aufnahmen wurden mit einer 1000-fachen Vergrößerung gemacht.

Aufgrund dieser Beobachtungen ist anzunehmen, dass E4orf3 mit POD-Komponenten interagiert. Da den PODs Funktionen bei einer Reihe von zellulären Vorgängen, wie der Apoptose, der Zellzyklusprogression oder der Differenzierung zugeteilt werden (2.4.2), könnte man die transformierenden Eigenschaften von E4orf3 zumindest teilweise damit erklären, dass durch die Interaktion und Modulation zellulärer POD-Komponenten diese Vorgänge gestört werden, wodurch es zur Transformation primärer Zellen kommt.

5.3.2 Identifizierung E4orf3-assoziiierter zellulärer Proteine

Nachdem Untersuchungen bezüglich des transformierenden Potenzials von E4orf3 darauf hinwiesen, dass möglicherweise Interaktionen mit POD-Komponenten eine Rolle spielen, konzentrierten sich meine Arbeiten zunächst auf die Identifikation solcher E4orf3-assoziiierter Proteine. Dabei waren zunächst Proteine von Interesse, die bekannterweise an der Kontrolle des Zellwachstums und der Tumorsuppression beteiligt sind. Als wichtige Beispiele sind hier p53, pRb, PML und CBP zu nennen. Schon zu Beginn der Arbeit wurde demonstriert, dass E4orf3 keinerlei Einfluss auf die Gleichgewichtsmengen von p53 ausübt. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Untersuchungen bezüglich einer E4orf3-p53-Interaktion durchgeführt. Ebenso konnten wir bereits eine physikalische Wechselwirkung mit der POD-Hauptkomponente PML ausschließen (Nevels *et al.*, 1999b). In Bezug auf frühere Daten, die zeigten, dass zusätzlich zu E4orf3 auch E1A mit den PODs assoziiert (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Ishov und Maul, 1996) und der Tatsache, dass E1A zusätzlich mit CBP/p300 interagiert (Subramanian *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1993), fokussierten sich meine Arbeiten betreffend der Identifizierung E4orf3-assoziiierter Proteine, auf CBP/p300. CBP und p300 sind zueinander homologe Transkriptionskoaktivatoren, die mit einer Vielzahl zellulärer Transkriptionsfaktoren (z. B. p53 und c-jun), nukleären Rezeptoren und Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren (Abb. 11; zur Übersicht: Goodman und Smolik, 2000). Sie besitzen Histonazetyltransferaseaktivität und modulieren die Vorgänge der Transkription vermutlich über Veränderungen der Chromatinstruktur. Ihre zentrale Rolle in der Steuerung der zellulären Proliferationskontrolle wird unter anderem durch die Tatsache illustriert, dass beide Proteine tumorsupprimierende Eigenschaften besitzen und prominente Ziele von viralen Onkoproteinen (z. B. SV40 TAg, Ad E1A, EBV EBNA2, HTLV-1 Tax, HHV8 vIRF und Polyomavirus LT) darstellen.

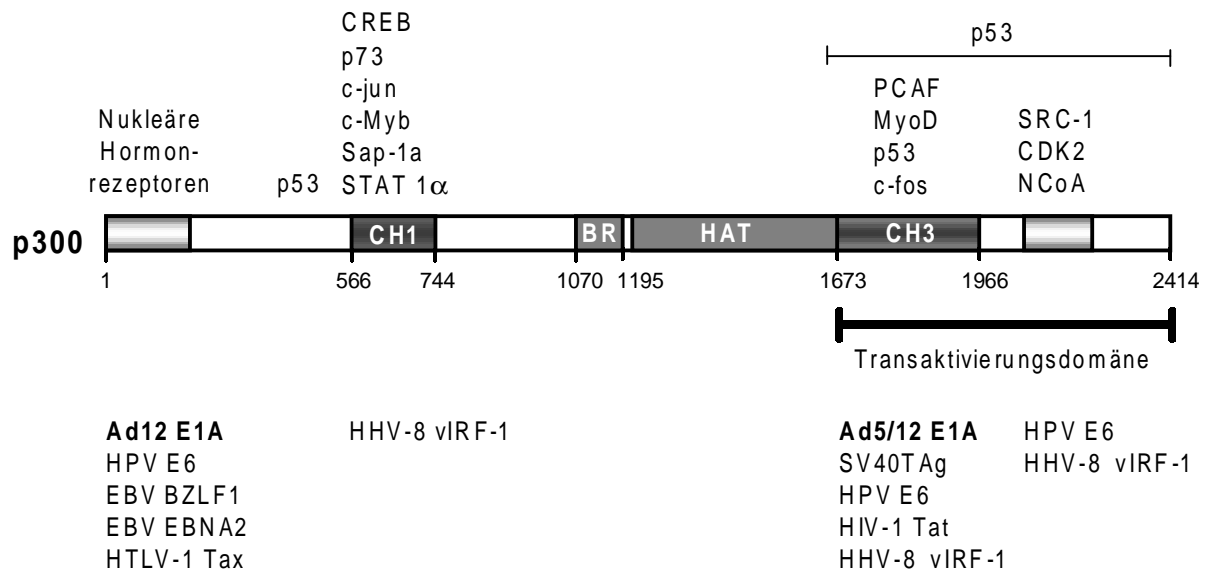


Abb. 11 Domänen des p300-Proteins

Dargestellt sind die Domänen des p300-Proteins, die mit viralen und zellulären Faktoren interagieren. Ad12 E1A bindet sowohl an den Aminoterminus als auch an die CH3-Domäne von p300, während für Ad5 E1A bisher nur eine Interaktion mit der CH3-Domäne gezeigt wurde. CH1/CH3: Cystein-Histidin-reiche Zinkfinger motive; BR: Bromodomäne; HAT: Histonazetyltransferase. Die Zahlen unterhalb der p300-Domänen stellen die Anzahl der Aminosäurereste dar.

5.3.3 Bindung von E4orf3 an p300

5.3.3.1 Immunpräzipitation von p300 und E4orf3

Um eine mögliche Interaktion zwischen E4orf3 und dem CBP-Homolog p300 nachzuweisen, wurden Koimmunpräzipitationsversuche (4.3.8) durchgeführt (Abb. 12).

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, dass sowohl in ABT29-Zellen als auch in transient transfizierten BRK1-Zellen über direkte Immunpräzipitation die Expression des E4orf3-Proteins nachgewiesen werden kann. Bei den Koimmunpräzipitationsexperimenten mit p300 konnte E4orf3 ebenfalls in den ABT29- und BRK1-Zellen präzipitiert werden. Damit wurde gezeigt, dass E4orf3 mit dem p300-Protein *in vivo* wechselwirken kann.

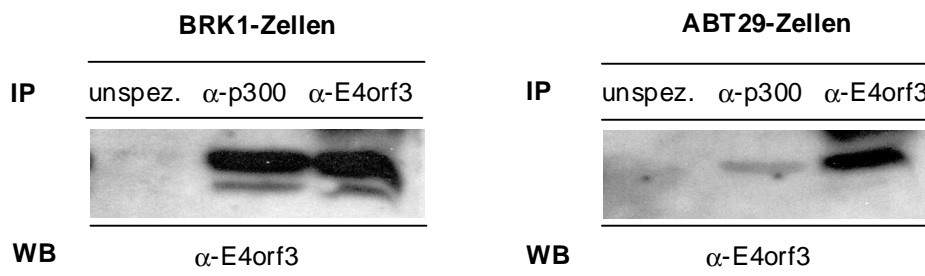


Abb. 12 Koimmunpräzipitation von E4orf3 mit p300

Es wurden 500 μ g Gesamtprotein aus ABT29-Zellen (stabile Expression von E1A, E1B und E4orf3) und BRK1-Zellen, die transient mit je 5,0 μ g der p300- und E4orf3-Expressionsplasmide nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert wurden, in die Koimmunpräzipitation eingesetzt. Die Präzipitation erfolgte mit dem p300-spezifischen Antikörper C20, dem E4orf3-spezifischen Antikörper 6A11 und einem unspezifischen Antikörper (unspez.) als Kontrolle. Anschließend wurden die Präzipitate über ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Detektion im *Western Blot* erfolgte mit dem E4orf3-spezifischen Antikörper 6A11.

5.3.3.2 Immunfluoreszenzanalysen zum Nachweis der p300-E4orf3-Interaktion

Zur weiteren Analyse der E4orf3-p300-Interaktion wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (4.3.9). Dabei war von Interesse, ob die gezeigte Wechselwirkung eine Kolokalisation der beiden Proteine bewirken kann und/oder eine subnukleäre Reorganisation der Proteine verursacht wird.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden (Abb. 13), dass p300 durch E4orf3 aus seiner diffusen oder punktförmigen Lokalisation im Zellkern in elongierte, fibrilläre Strukturen relokalisiert wird und gleichzeitig mit E4orf3 in diesen Strukturen kolokalisiert. Dafür spricht auch die Beobachtung von Wienzek *et al.*, dass Ad5 E4orf3 das POD-assoziierte Protein CBP (*CREB binding protein*) in HeLa/PML⁺⁺-Zellen in *nuclear tracks* lokalisiert (Wienzek und Dobbelsstein, 2001). Im Gegensatz dazu konnte E4orf6, das diffus im Zellkern vorliegt, keine Umstrukturierung des p300-Proteins hervorrufen. Außerdem konnte bei einer Überlagerung beider Bilder keine Kolokalisation beobachtet werden. Somit geht möglicherweise mit der Bindung von E4orf3 an p300 eine Umstrukturierung der p300-Lokalisation einher. Dabei wird das p300-Protein in fibrillären Strukturen sequestriert, die auch das E4orf3-Protein enthalten.

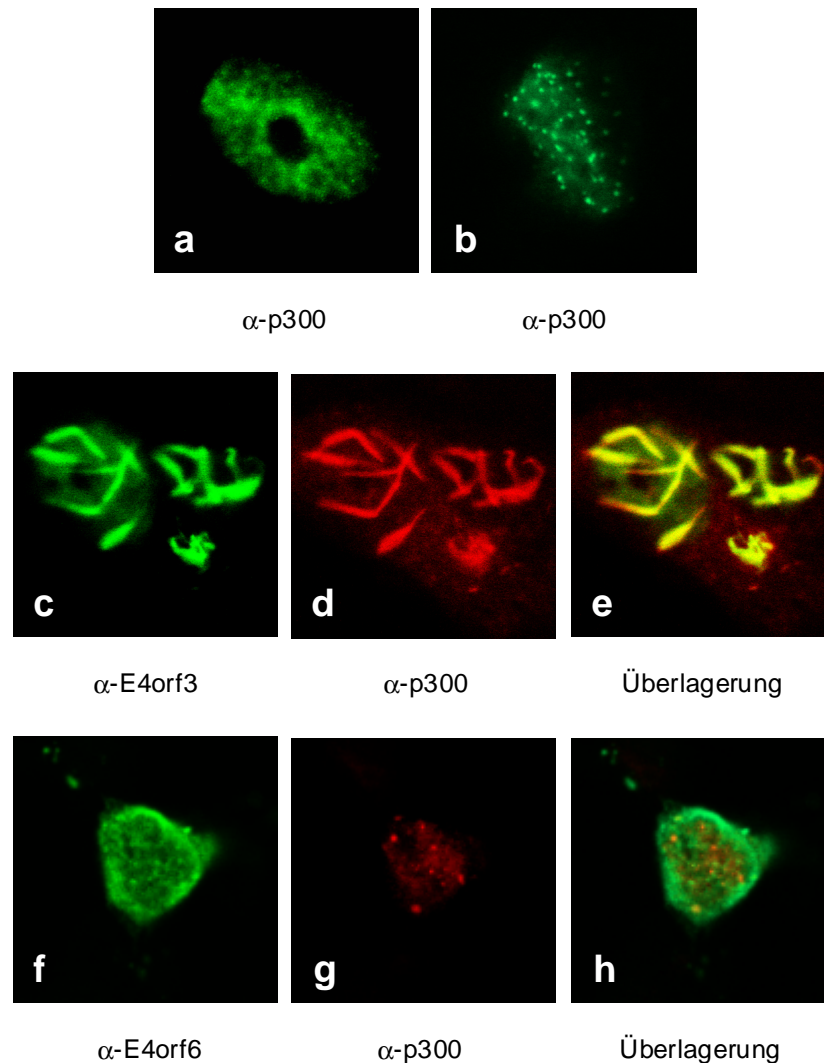


Abb. 13 Immunfluoreszenzanalysen von E4orf3 und p300

BRK1-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit je 5,0 μ g der HA E4orf3-, HA E4orf6- und p300-Expressionsplasmide transient nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Nachdem die Zellen nach ca. 48 h mit Methanol fixiert wurden, erfolgte die Inkubation mit den für die Proteine spezifischen Antikörpern.

(a, b) Zum Nachweis der eigentlichen Lokalisation des p300-Proteins wurden BRK1-Zellen mit dem p300-Expressionsplasmid transfiziert und anschließend mit dem p300-spezifischen Antikörper RW128 (1 : 10) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-gekoppelter anti-Maus-Antikörper verwendet. (c – e) BRK1-Zellen wurden mit dem HA-E4orf3- und dem p300-Expressionsplasmid transfiziert und anschließend mit den Antikörpern 3F10 (anti-HA; 1 : 200) und RW128 (anti-p300; 1 : 10) inkubiert. Der Antikörper 3F10, der den HA-Anteil des E4orf3-Expressionsplasmids detektiert, wurde mit einem FITC-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper nachgewiesen (c), der p300-spezifische Antikörper RW128 mit einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (d). Die Überlagerung beider Bilder erscheint gelb (e). (f – h) Als Kontrolle wurden BRK1-Zellen mit dem HA-E4orf6- und dem p300-Expressionsplasmid transfiziert. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern 3F10 (anti-HA; 1 : 200) und RW128 (anti-p300; 1 : 10). Der Antikörper 3F10, der den HA-Anteil des E4orf6-Expressionsplasmids detektiert, wurde mit einem FITC-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper nachgewiesen (f), der p300-spezifische Antikörper RW128 mit einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (g). Die Überlagerung beider Bilder wird in (h) gezeigt. Alle Aufnahmen wurden mit Hilfe des konfokalen Laserscanningmikroskops mit einer 5000-fachen Vergrößerung gemacht.

5.3.4 Identifizierung der p300-Interaktionsdomänen

Zur Eingrenzung der für die Interaktion mit E4orf3 verantwortlichen Domänen im p300-Protein wurden In-vitro-Bindungsstudien durchgeführt. Diese basierten auf Daten anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, dass die E1A 12S- und E1A 13S-Proteine die Koaktivatorfunktionen von CBP/p300 vermutlich über die direkte Bindung an die CH3-Domäne und dem Aminoterminus von CBP/p300 inhibieren (vgl. Abb. 11; Jones, 1995; Lundblad *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996). Die Bindung seitens E1A erfolgt über die aminoterminal Domäne sowie einem Teil der CR1-Region. Um der Frage nachzugehen, ob E4orf3 an die gleichen Domänen von p300 bindet wie E1A, wurden zunächst GST-p300-Fusionsproteine hergestellt und diese in In-vitro-Bindungsstudien eingesetzt.

5.3.4.1 Herstellung von GST-p300 Fusionsproteinen

Zunächst wurden in Anlehnung an veröffentlichte GST-CBP-Fusionsproteine, CBP-homologe Bereiche im p300-Protein identifiziert (Yang *et al.*, 1996). Ausgehend von diesen Daten wurden Konstrukte erzeugt, die zum einen den Aminoterminus und zum anderen verschiedene Fragmente des Carboxyterminus von p300 enthalten (Abb. 14). Die einzelnen Fragmente wurden mit Hilfe des *Glutathione S-transferase (GST) Gene Fusion Systems* (Amersham Pharmacia Biotech) an die kodierende Sequenz von GST aus *Schistosoma japonicum* fusioniert. Dieses System erleichtert die Fremdproteinexpression in *E. coli* und ermöglicht eine schnelle affinitätschromatographische Aufreinigung über Glutathion-Sepharose (Smith und Johnson, 1988).

Die Konstrukte wurden mittels PCR hergestellt. Dazu wurde das Ausgangsplasmid pcDNA3-p300 als Matrize für die PCR-Reaktionen eingesetzt (4.2.6). Neben den sequenzspezifischen Informationen enthielten die 5'-Oligonukleotide Überhänge mit der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bam*HI, die 3'-Oligonukleotide Überhänge mit der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Eco*RI. Die durch PCR-Amplifikation erhaltenen Produkte wurden mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (4.2.4) aufgetrennt und aus dem Gel isoliert (4.2.5). Die resultierenden Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI

gespalten (4.2.7.1) und erneut gereinigt. Danach wurden die Fragmente gerichtet in den Expressionsvektor pGEX-2T ligiert (4.2.7.2), der zuvor ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* gespalten wurde (4.2.7.1). Die fertigen Konstrukte wurden anschließend durch Sequenzanalyse überprüft (4.2.7.3/4.2.7.4).

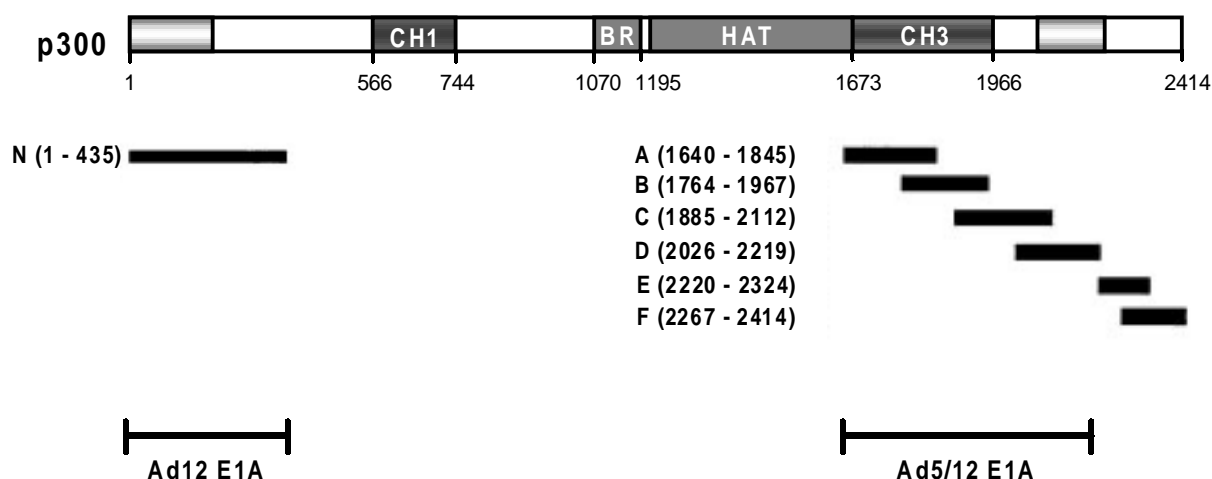


Abb. 14 Schematische Darstellung der p300-Fragmente, die zur Fusion mit GST ausgewählt wurden

Dargestellt sind die Domänen des p300-Proteins. Mit den schwarzen Balken sind die Bereiche markiert, die zur Fusion mit GST aus dem pcDNA-p300-Plasmid amplifiziert wurden. Die Zahlen hinter den Fragmentbezeichnungen stellen die Aminosäurepositionen dar. Weiterhin sind die Bereiche angegeben an die Ad5 bzw. Ad12 E1A bindet.

5.3.4.2 Expression der GST-p300-Fusionsproteine

Zur Optimierung der Ausbeute der einzelnen Fusionsproteine wurden verschiedene *E. coli*-Stämme für die Expression ausgetestet. Nach der Expression im Kleinstmaßstab (5 ml Ansätze, ohne Aufreinigung) wurden jeweils Aliquots über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt (4.3.5). Die Expression der Proteine wurde anschließend mittels Silberfärbung nachgewiesen (4.3.6). Die besten Ausbeuten wurden mit dem *E. coli* TOPPTM3-Stamm erzielt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dessen wurden diese zur Transformation mit den pGEX-2T-Konstrukten ausgewählt und die GST-Fusionsproteine exprimiert, aufgereinigt und an Glutathion-Sepharose gebunden (4.3.2). Zur Kontrolle wurde jeweils ein Aliquot der Fusionsproteine mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (4.3.5) und anschließendem *Western Blot* (4.3.7) überprüft (Abb. 15).

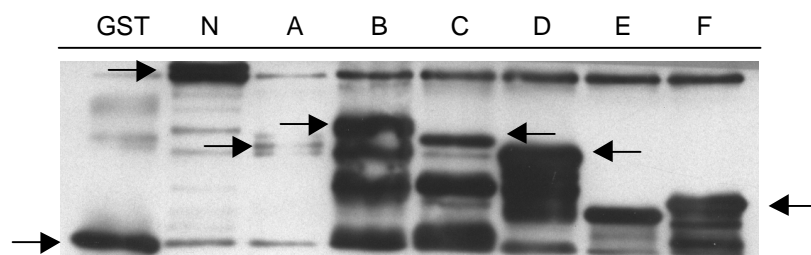


Abb. 15 Analyse der Expression von GST-p300-Fusionsproteinen in *E. coli* TOPP™3

Aliquots der verschiedenen GST-Fusionsproteine wurden in zweifach-konzentriertem Laemmli-Auflaufspuffer aufgekocht und über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose erfolgte die Detektion mit Hilfe eines GST-Antikörpers, der wiederum mit einem HRP-gekoppelten anti-Ziege-Antikörper nachgewiesen wurde. GST: Expression des GST-Anteils alleine; N, A – F: Expression der verschiedenen p300-Fragmente. Pfeile markieren Banden, die den entsprechenden GST-Fusionsproteinen entsprechen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass mit Ausnahme von Fragment A alle Fusionsproteine in gut detektierbaren Mengen vorhanden sind. Nachdem die GST-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt worden waren, wurden die Mengen mit Hilfe von coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgelen (4.3.6) abgeschätzt.

5.3.4.3 In-vitro-Bindungsstudie zur Identifizierung der p300-Interaktionsdomänen

Zur Identifizierung der p300-Interaktionsdomänen wurde ein GST-Pulldown (4.3.3) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden an Glutathion-Sepharose gebundene GST-Fusionsproteine mit möglichen Interaktionspartnern inkubiert und gebundene Komponenten durch Zentrifugation kosedimentiert (Abb. 16; Kaelin *et al.*, 1991).

Es zeigte sich, dass E4orf3 an die gleichen Domänen von p300 bindet wie E1A. Einzige Ausnahme bildete Fragment A, das nur eine Wechselwirkung mit E1A aufweist. Wie erwartet findet keine Interaktion zwischen E4orf6 und p300 statt. Ebenso wurde keine Interaktion der radioaktiv markierten Proteine mit dem GST-Anteil alleine beobachtet.

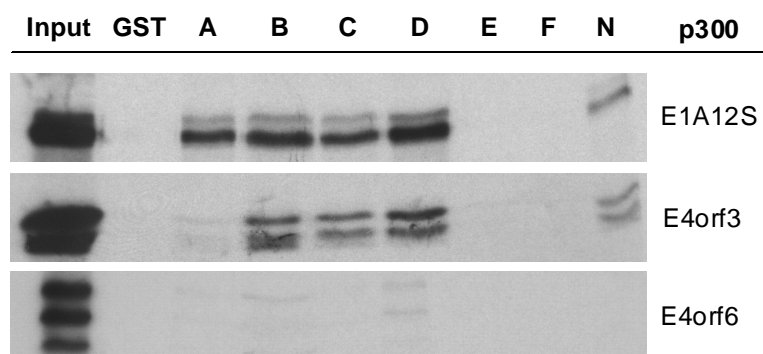


Abb. 16 GST-Pulldown zur Identifizierung der E4orf3-p300-Interaktionsdomänen

Die als GST-Fusionsproteine exprimierten p300-Fragmente wurden mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem Ad5 E1A 12S, Ad5 E4orf6 und Ad5 E4orf3 inkubiert, mehrmals stringent gewaschen und über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Verstärkung der radioaktiven Signale wurde das Gel in *Enlight* (EnerGene) inkubiert und vakuumgetrocknet. Gebundene Proteine wurden mittels Autoradiografie detektiert.

Somit können die für die Wechselwirkung verantwortlichen Bereiche in p300 auf den Aminotermminus, die CH3-Domäne und einen glycinreichen Bereich (Fragment D) festgelegt werden (Abb. 17). Bei E4orf3 erscheinen zwei deutlich äquimolare Banden, die vermutlich aufgrund der Nutzung alternativer ATG-Startkodons gebildet werden.

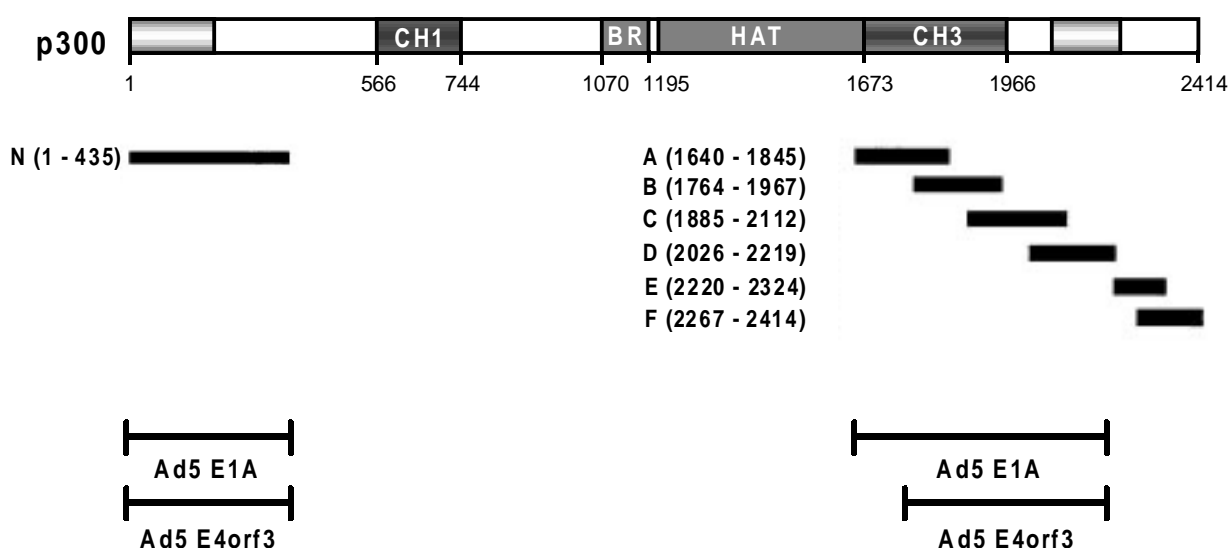


Abb. 17 Bindung von Ad5 E1A und Ad5 E4orf3 an p300

Dargestellt sind die Fragmente von p300 (A – F, N), welche für die In-vitro-Bindungsstudien eingesetzt wurden sowie die Bereiche an die Ad5 E1A und Ad5 E4orf3 binden.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass ebenso wie E1A das E4-Genprodukt mit p300 interagiert. Dabei konnte eine Relokalisation von p300 in E4orf3-beinhaltende fibrilläre Strukturen beobachtet werden. Weiterhin konnten die für die Wechselwirkung verantwortlichen Bereiche seitens p300 identifiziert werden. Interessanterweise bindet E4orf3 an Regionen, die ebenso für die Wechselwirkung mit E1A verantwortlich sind (Yang *et al.*, 1996). Somit können erste Parallelen zwischen E4orf3 und E1A hergestellt werden. Um mögliche redundante Funktionen von E4orf3 zu E1A abzuklären, wurden als nächstes Luziferase-Reportergenstudien durchgeführt. Die Untersuchungen waren dabei Arbeiten angelehnt, in denen gezeigt worden war, dass E1A die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p300 reprimiert (Jones, 1995; Lundblad *et al.*, 1995).

5.3.5 Einfluss von E4orf3 auf die p300-Aktivität

Die Bestimmung des Einflusses von E4orf3 auf die p300-vermittelte Transkriptionsaktivierung wurde mit einem vereinfachten Enhancer/Promotor-System durchgeführt (Abb. 18).

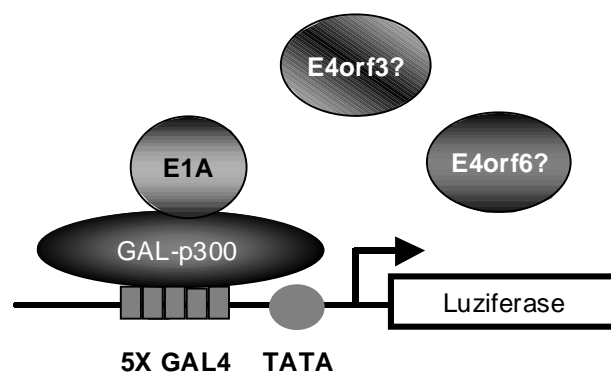


Abb. 18 Funktionsprinzip des Luziferase-Versuchs

Schematisch dargestellt ist das Reportergenkonstrukt mit fünf GAL4-Bindungsstellen und der TATA-Box, welche dem Luziferasegen vorgeschaltet sind. An die GAL4-Bindungsstellen kann p300 binden, das in den pG4-Vektor mit GAL-Domänen kloniert ist. Durch die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p300 wird die Expression der Luziferase induziert, was in relativen Lichteinheiten gemessen wird. Bei einer zusätzlichen Expression von E1A bindet dieses an p300 und reprimiert die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p300.

Dazu wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem die kodierende Sequenz für das p300-Protein mit der kodierenden Sequenz der GAL4-DNA-Bindedomäne fusioniert

ist. Somit kann das resultierende Fusionsprotein mit den 5 vorgeschalteten GAL4-Bindungsstellen des C3G5-luc-Reportergenkonstruktes wechselwirken. Dadurch wird gewährleistet, dass der p300-Anteil des Fusionsproteins relativ zur TATA-Box des Reportergenkonstruktes positioniert wird und damit seine Koaktivatorfunktion ausüben kann.

Die Ermittlung der Promotoraktivität des C3G5-luc-Reportergenkonstruktes sowie dessen Beeinflussung durch verschiedene Effektorplasmide wurden mit Hilfe des *Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems* (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (4.7; Abb. 19).

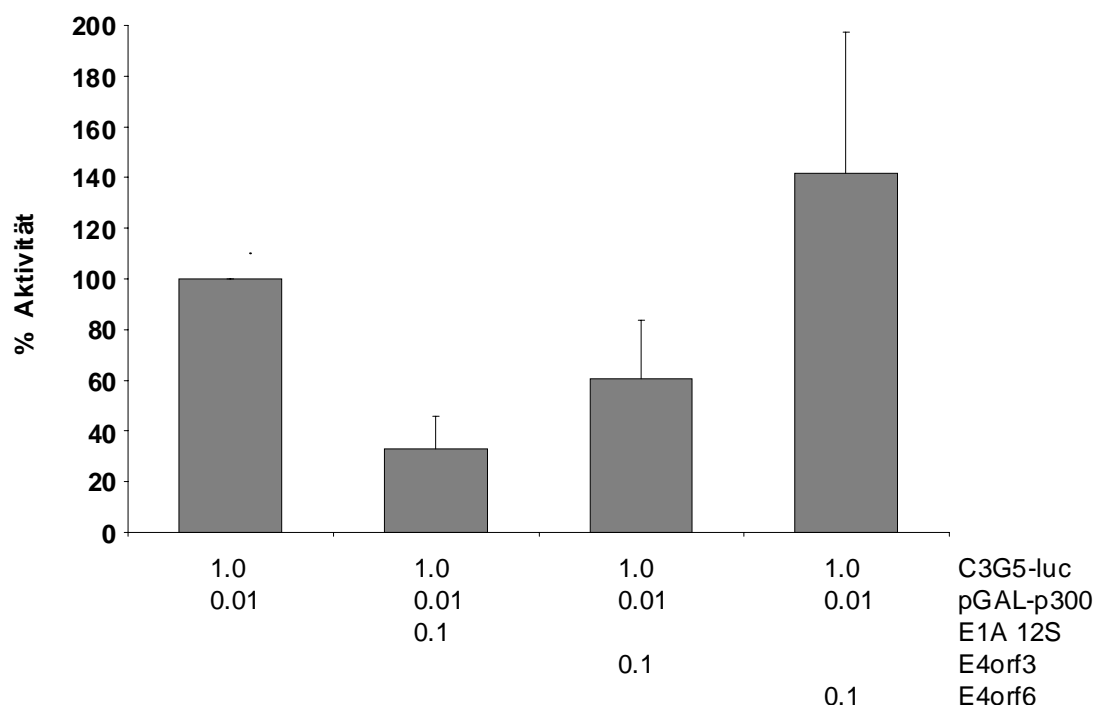


Abb. 19 Modulation der Transkriptionsaktivierung von p300 durch Ad5 E1A, Ad5 E4orf3 und Ad5 E4orf6

Es wurden 1×10^5 BRK1-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (*6-well*) ausgesät und am nächsten Tag mit $1,0 \mu\text{g}$ des Reporterplasmids pGL-C3G5-luc und den Effektorplasmiden pG4-p300 ($0,01 \mu\text{g}$), pCMV-E1A 12S ($0,1 \mu\text{g}$), pcDNA3-E4orf3 ($0,1 \mu\text{g}$) und pcDNA3-E4orf6 ($0,1 \mu\text{g}$) nach der Liposomen-Methode transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Lysis-Puffer lysiert und die Aktivitäten der einzelnen Konstrukte mit dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) bestimmt. Die Expression des Luziferasereporters in Abhängigkeit der Koexpression des GAL-p300-Konstruktes wurde quantitativ bestimmt und als Referenzwert auf 100 % normiert. Die aus der Expression des Luziferasereporters abzuleitende Promotoraktivität des Reporterkonstruktes in Abhängigkeit der zusätzlichen Effektoren wurde entsprechend auf die Referenzaktivität umgerechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von vier voneinander unabhängigen Versuchen.

In diesen Versuchen wurde aus der durch GAL-p300 beeinflussten Expression des Luziferasereporters die Promotoraktivität als Referenzwert auf 100 % normiert. Die zusätzliche Expression von E1A hatte eine Verringerung der Promotoraktivität auf 30 % zur Folge. Damit findet wie erwartet eine Repression der Koaktivatorfunktion von p300 durch Ad5 E1A statt. Ein ähnlicher Effekt wurde für Ad5 E4orf3 beobachtet. Die Promotoraktivität des Reporterkonstruktes wurde auf 60 % verringert. Dagegen konnte ein eher steigernder Effekt auf die Koaktivatorfunktion von p300 durch E4orf6 beobachtet werden.

Somit wurden erstmals Parallelen zwischen E4orf3 und E1A auch auf funktioneller Ebene gezeigt. Zur weiteren Abklärung möglicher redundanter Funktionen wurden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt.

5.3.6 Komplementation einer p300-bindungsdefizienten E1A-Mutante durch E4orf3

Die für die Transformation verantwortlichen Bereiche im E1A-Protein lokalisieren am Aminoterminal sowie in Regionen hoch konservierter Aminosäuresequenzen, die als CR1 und CR2 (CR, *conserved region*) bezeichnet werden (Subramanian *et al.*, 1988; Jelsma *et al.*, 1989; Whyte *et al.*, 1989). Die Interaktion von E1A mit p300 erfolgt sowohl über die aminoterminal Domäne als auch über einen Teil der CR1-Region (Stein *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993; Arany *et al.*, 1995; Lundblad *et al.*, 1995). Für E1A-Proteine, die Mutationen im aminoterminalen Bereich besitzen, wurde gezeigt, dass diese nicht mehr mit p300 interagieren sowie die Fähigkeit verloren haben primäre Rattennierenzellen zu transformieren (Subramanian *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1993). Bei einer redundanten Funktion von E4orf3 zu E1A könnte man davon ausgehen, dass E4orf3 die Funktion von E1A zumindest teilweise bei der Transformation ersetzen kann. Um diese Vermutung weiter abzuklären, wurden Komplementationsversuche durchgeführt, die auf BRK-Transformationsversuchen (4.4.5) basieren (Abb. 20).

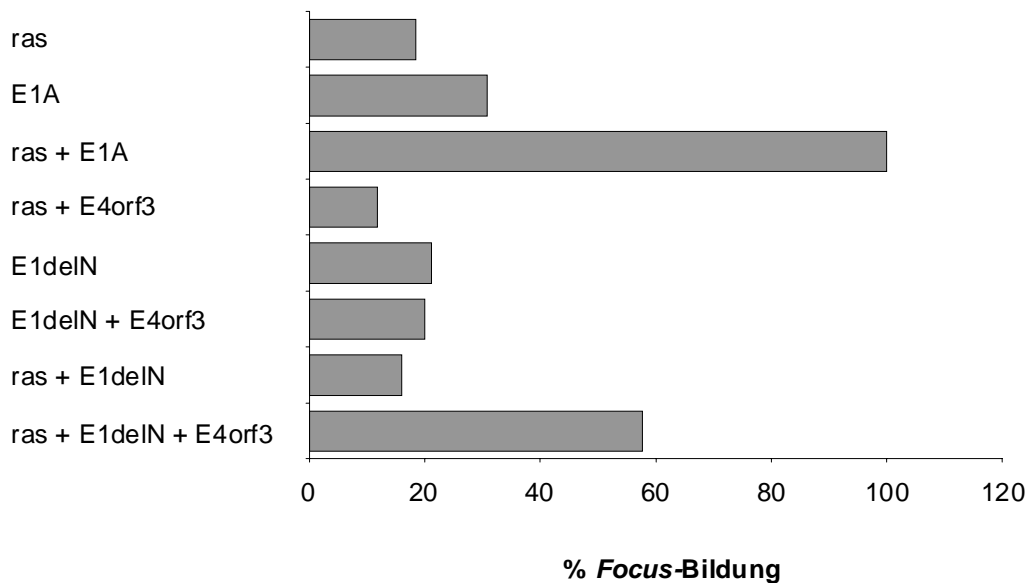


Abb. 20 Komplementation einer p300-bindungsdefizienten E1A-Mutante durch Ad5 E4orf3

Zur Untersuchung von redundanten Funktionen von E4orf3 und E1A wurden Komplementationsversuche durchgeführt. Dazu wurden in Transformationsversuchen verschiedene Plasmidkombinationen ausgetestet, die in der Abbildung angegeben sind. Es wurden jeweils 5,0 µg EJ-ras, 1,5 µg CMV-E1A 12S, 1,5 µg pCMV-E1delN und 1,0 µg pcDNA3-E4orf3 eingesetzt. Die Anzahl der *Foci* aus der Plasmid-Kombination EJ-ras und pCMV-E1A 12S wurde als 100 %-Referenzwert festgelegt. Hier betrug die durchschnittliche Anzahl der *Foci* 52. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass E1A alleine in der Lage ist primäre Rattennierenzellen zu transformieren, was in der Bildung von *Foci* resultierte. Dieser Effekt wurde in Kombination mit dem proto-Onkogen *ras* stark gesteigert. Im Gegensatz dazu war Ad5 E4orf3 in Verbindung mit *ras* nicht in der Lage, primäre Rattennierenzellen effizient zu transformieren. Die aminoterminalen Deletionsmutante von E1A zeigte gegenüber dem wt-E1A eine Reduktion in der *Focus*-Formation. Diese konnte weder in Kombination mit *ras* noch mit Ad5 E4orf3 aufgehoben werden. Ein deutlicher Anstieg der *Focus*-Bildung konnte jedoch in Kombination mit *ras* und Ad5 E4orf3 beobachtet werden, was wiederum darauf hinweist, dass E4orf3 teilweise die aminoterminalen Funktionen von E1A im Transformationsvorgang primärer Rattenzellen komplementieren kann.

Abschließend kann man sagen, dass Ad5 E4orf3 ähnlich wie Ad5 E1A an p300 bindet und dessen transkriptionsaktivierenden Eigenschaften moduliert. Zusätzlich ist Ad5 E4orf3 in der Lage teilweise die Aufgaben von E1A beim Transformationsprozess zu

übernehmen. Mit diesen Ergebnissen wurde erstmals gezeigt, dass Ad5 E4orf3 und Ad5 E1A bezüglich der Wechselwirkung mit p300 zueinander redundante Funktionen besitzen.

5.3.7 Untersuchung der E4orf3-p300-Interaktion verschiedener Adenovirus Serotypen

Nachdem für Ad5 E4orf3 sowohl eine Interaktion mit p300 als auch die Modulation des Transkriptionskoaktivators auf funktioneller Ebene nachgewiesen wurde, fanden weitere Untersuchungen mit den E4orf3-Proteinen der Adenovirus Serotypen 9, 12 und 40 in Bezug auf eine mögliche Wechselwirkung mit p300 statt. Ziel dieser Experimente war es, die Fähigkeit der E4orf3-Proteine bezüglich der (i) Relokalisation von p300, (ii) des Bindungsverhaltens an p300 sowie (iii) des Einflusses auf die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p300 zu untersuchen.

5.3.7.1 Immunfluoreszenzanalysen zur E4orf3-p300-Interaktion verschiedener Serotypen

Zunächst wurde geprüft, ob die E4orf3-Proteine der Serotypen 9, 12 und 40 ähnlich wie Ad5 E4orf3 das p300-Protein aus der diffusen oder punktförmigen Lokalisation in fibrilläre Strukturen relokalisieren können und eventuell eine Kolokalisation der Proteine zu beobachten ist. Dazu wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (4.3.9; Abb. 21).

Es war zu beobachten, dass die E4orf3-Proteine der Serotypen 9 und 12 ebenso wie Ad5 E4orf3 in elongierten, fädigen Strukturen lokalisieren. Abweichend davon fand man das E4orf3-Genprodukt von Ad40 in eher punktförmigen Strukturen vor. Weiterhin konnte eine Umverteilung von p300 durch das E4orf3-Protein von Ad9 und Ad12 in fibrilläre Strukturen beobachtet werden. Während bei Ad5 E4orf3 eine vollständige Kolokalisation mit p300 stattfand, konnte dies für Ad9 E4orf3 und Ad12 E4orf3 nur teilweise gezeigt werden. Im Gegensatz zu Ad9 und Ad12 E4orf3 kann man bei Ad40 E4orf3 weder eine Relokalisation von p300 noch eine Kolokalisation beider Proteine erkennen.

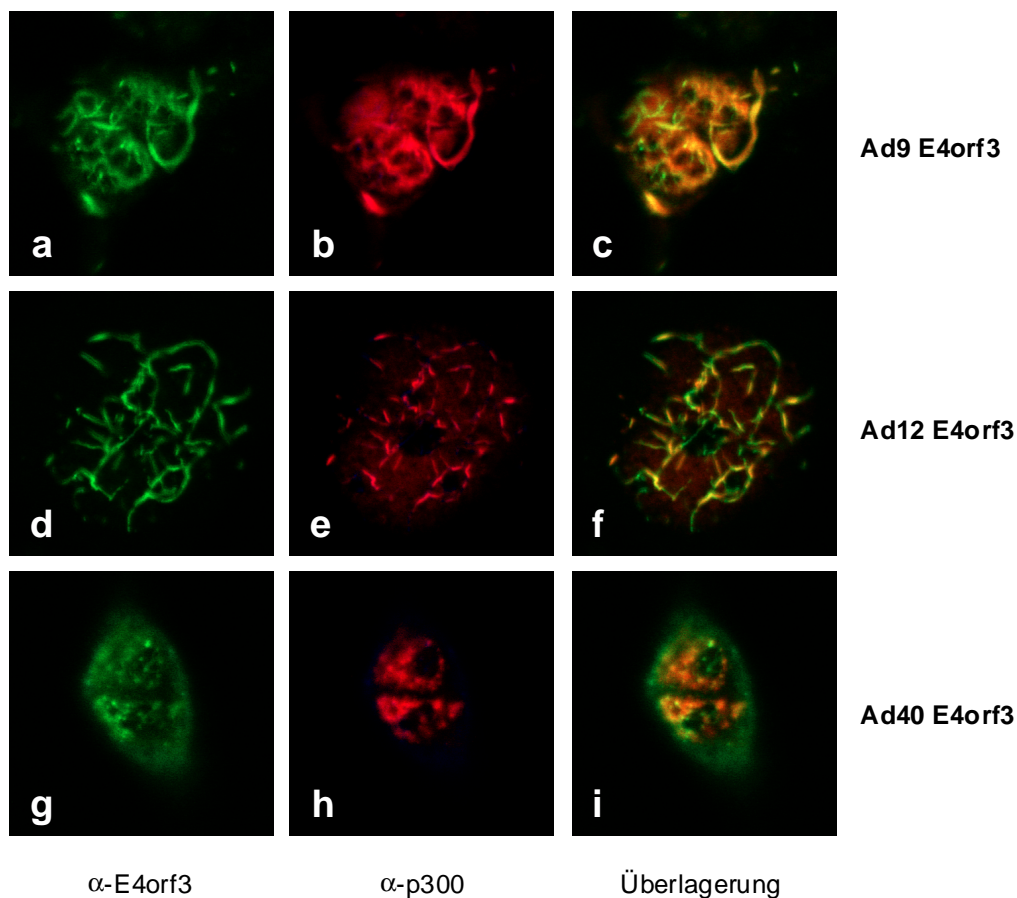


Abb. 21 Immunfluoreszenzanalysen zur Relokalisation von p300 induziert durch das E4orf3-Protein verschiedener Serotypen

BRK1-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit je 5,0 µg des Plasmids pcDNA3-p300 und je 5,0 µg eines der Plasmide pcDNA3-HA Ad9 E4orf3, pcDNA3-HA Ad12 E4orf3 oder pcDNA3-HA Ad40 E4orf3 nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Nachdem die Zellen mit Methanol fixiert wurden erfolgte der Nachweis der Proteine mit den Antikörpern RW128 (anti-p300; 1 : 10) und 3F10 (anti-HA; 1 : 200). RW128 wurde mit einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper detektiert (**b**, **e**, **h**) und 3F10 mit einem FITC-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (**a**, **d**, **g**). Die Überlagerung wird in **c**, **f** und **i** gezeigt. Alle Aufnahmen wurden mit einer 1000-fachen Vergrößerung gemacht.

5.3.7.2 In-vitro-Bindungsstudie von p300 mit den E4orf3-Proteinen verschiedener Serotypen

Als weiteren Schritt zur Abklärung der p300-Interaktion wurden In-vitro-Bindungsstudien mit Hilfe eines weiteren *GST-Pulldowns* durchgeführt (4.3.3). Dazu wurden die gleichen GST-p300-Fusionsproteine verwendet, mit denen die In-vitro-Bindung von Ad5 E4orf3 an p300 gezeigt worden war (5.3.4.3).

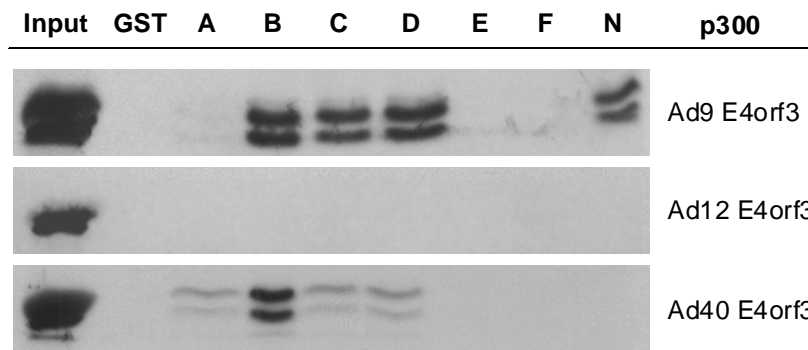


Abb. 22 In-vitro-Bindungsstudie der E4orf3-p300-Interaktion verschiedener Serotypen

Die als GST-Fusionsproteine exprimierten p300-Fragmente wurden mit *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten E4orf3-Proteinen der verschiedenen Serotypen inkubiert, mehrmals stringent gewaschen und über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Verstärkung der radioaktiven Signale wurde das Gel in *Enlight* (EnerGene) inkubiert und vakuumgetrocknet. Gebundene Proteine wurden mittels Autoradiografie detektiert.

Das Ergebnis dieser GST-Pulldown-Versuche zeigte, dass Ad9 E4orf3 an die selben p300-Fragmente bindet wie Ad5 E4orf3 (Abb. 22/Abb. 16). Im Gegensatz dazu konnte für Ad40 E4orf3 nur mit Fragment B eine starke Interaktion beobachtet werden. Interessanterweise konnte für Ad12 E4orf3 keine Wechselwirkung nachgewiesen werden, obwohl p300 durch Ad12 E4orf3 in *tracks* relokalisiert wird. Somit zeigen die E4orf3-Proteine der Serotypen 9, 12 und 40 ein deutlich unterschiedliches Bindungsverhalten, das mit den Daten aus den Immunfluoreszenzanalysen nur partiell übereinstimmt.

5.3.7.3 Einfluss der E4orf3-Proteine verschiedener Serotypen auf die Transkriptionsaktivität von p300

Um weitere Hinweise zur Wechselwirkung zwischen p300 und den E4orf3-Proteinen der Serotypen 9, 12 und 40 zu erhalten wurden erneut Luziferase-Reportergenstudien durchgeführt (4.7; 5.3.6; Abb. 23).

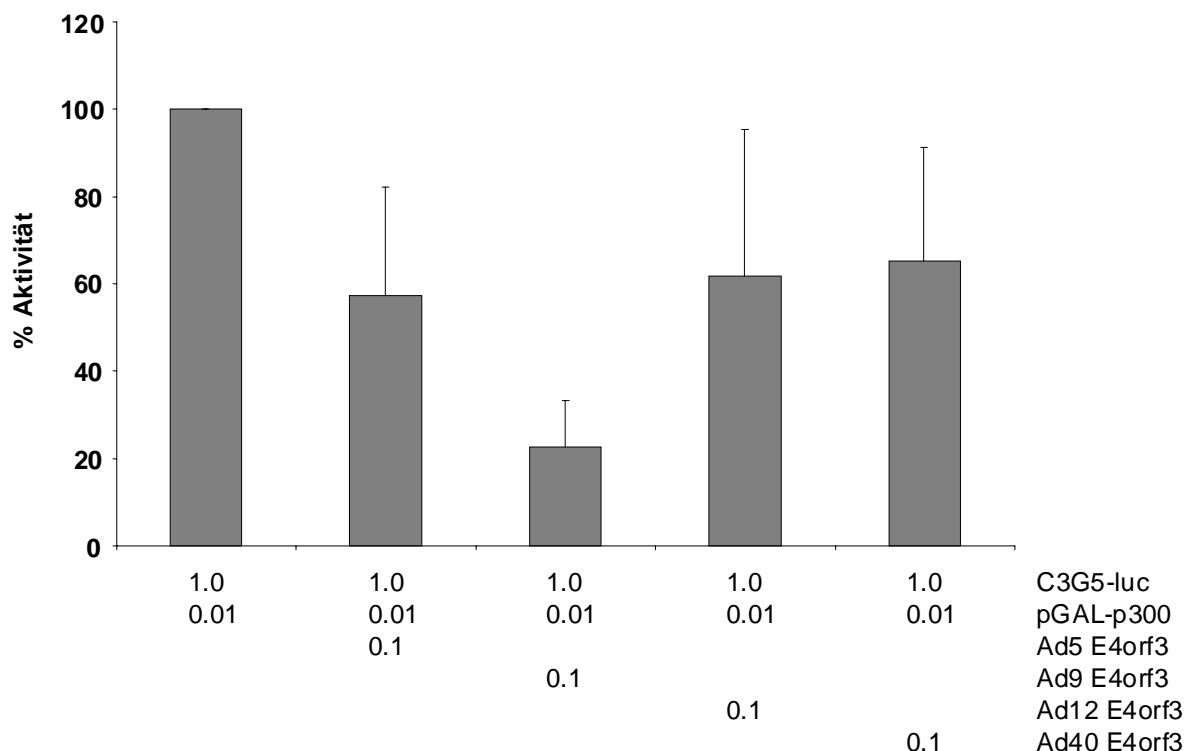


Abb. 23 Modulation der Transkriptionsaktivierung von p300 durch E4orf3-Proteine verschiedener Serotypen

1×10^5 BRK1-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well) ausgesät und am nächsten Tag mit $1,0 \mu\text{g}$ des Reporterplasmids pGL-C3G5-luc und den Effektorplasmiden pG4-p300 ($0,01 \mu\text{g}$), pcDNA3-HA Ad5 E4orf3 ($0,1 \mu\text{g}$), pcDNA3-HA Ad9 E4orf3 ($0,1 \mu\text{g}$), pcDNA3-HA Ad12 E4orf3 ($0,1 \mu\text{g}$) und pcDNA3-HA Ad40 E4orf3 ($0,1 \mu\text{g}$) nach der Liposomen-Methode transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Lysis-Puffer lysiert und die Aktivitäten der einzelnen Konstrukte mit dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) bestimmt. Die Expression des Luziferasereporters bei Koexpression des GAL-p300-Konstruktes wurde quantitativ bestimmt und als Referenzaktivität auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von vier voneinander unabhängigen Versuchen.

Interessanterweise waren die Orf3-Proteine der Serotypen 9, 12 und 40 ebenso wie Ad5 E4orf3 in der Lage, die Promotoraktivität des Reportersystems, und damit die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p300 zu reprimieren. Während sich die E4orf3-Proteine der Serotypen 12 und 40 ähnlich wie Ad5 E4orf3 verhielten und die Aktivität auf ca. 60 % reduzierten, zeigte Ad9 E4orf3 die stärkste Reprimierung unter den verschiedenen E4orf3-Proteinen. Dabei war der Einfluss von Ad9 E4orf3 mit dem von Ad5 E1A vergleichbar.

5.4 Identifizierung funktionell aktiver Bereiche im E4orf3-Protein durch Mutationsanalyse

Zur Eingrenzung funktionell aktiver Bereiche im E4orf3-Protein, die zur Transformation primärer Zellen beitragen, wurden Aminosäureaustausche im E4orf3-Polypeptid durchgeführt. Dabei wurden Aminosäuren gewählt, die in fast allen bisher sequenzierten humanen Serotypen (Ad2, Ad5, Ad9, Ad12, Ad40) konserviert sind (Abb. 24).

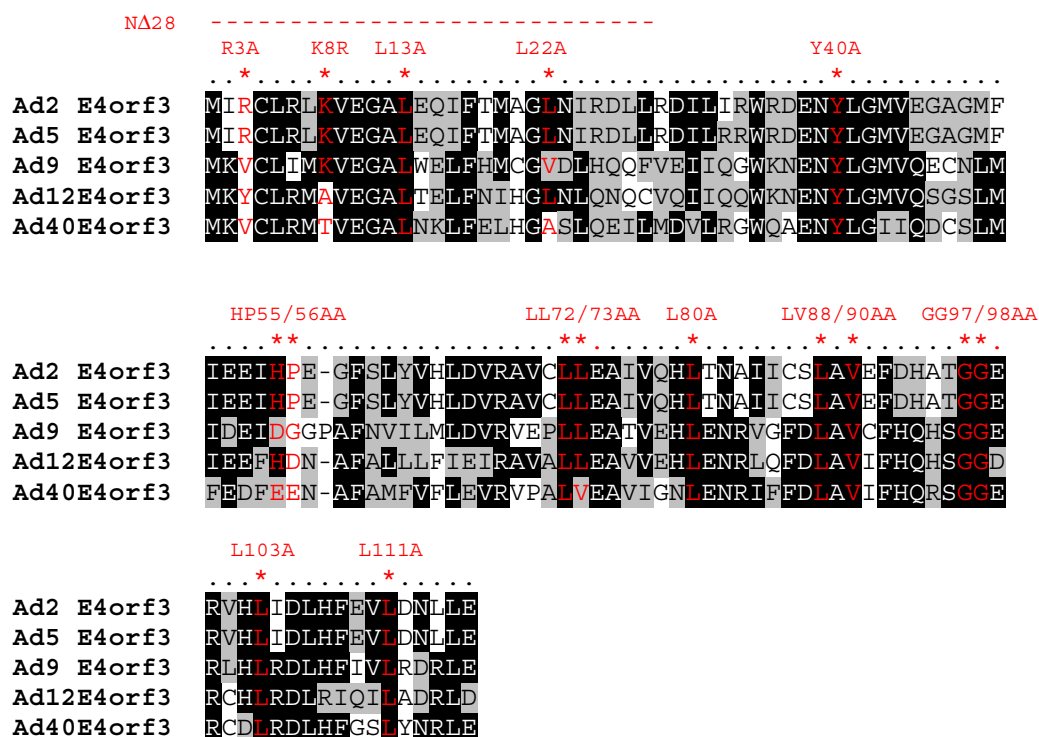


Abb. 24 Aminosäurevergleich des E4orf3-Proteins verschiedener Adenovirus-Serotypen

Dargestellt sind die E4orf3-Aminosäuresequenzen der Serotypen 2, 5, 9, 12 und 40. Konservierte Bereiche sind schwarz unterlegt, homologe Bereiche grau. Die Aminosäureaustausche sowie die Deletionsmutante sind rot markiert.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit waren bereits die Mutanten L13A, Y40A, LL72/73AA, L80A, L103A und L111A hergestellt worden (Täuber, 1998). Zusätzlich zu diesen wurden nun während der Doktorarbeit die Mutanten R3A, K8R, NA28, L22A, HP55/56AA, LV88/90AA und GG97/98AA konstruiert.

5.4.1 Konstruktion und Expression von E4orf3-Mutanten

5.4.1.1 Konstruktion der E4orf3-Mutanten

Die Herstellung der E4orf3-Punktmutanten erfolgte mit Hilfe des *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene unter Verwendung der unter 3.3.1 aufgeführten Oligonukleotide. Als Matrize diente pcDNA3-HA E4orf3. Mit Ausnahme der Mutante K8R fand bei allen anderen Punktmutanten ein Austausch gegen Alanin statt. Dadurch wird die sterische Behinderung durch die ersetzte Aminosäure auf ein Minimum verringert.

Eine bereits bestehende aminoterminaler Deletionsmutante, N Δ 28, wurde in den Expressionsvektor pcDNA3 umklont. Dazu wurde das Konstrukt pGEX-2T-E4orf3 N Δ 28 sowie der Vektor pcDNA3 mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI präparativ gespalten (4.2.7.1) und über Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (4.2.4). Im Anschluss daran erfolgte die Ligation und Transformation (4.2.7.2). Die erhaltenen Klone wurden durch Sequenzierung überprüft (4.2.7.4).

5.4.1.2 Expression der E4orf3-Mutanten

Die Expression der E4orf3-Mutanten wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen überprüft (4.3.9). Dabei wurde bei allen oben genannten Mutanten eine Expression nachgewiesen. Die überwiegende Mehrheit der Mutanten zeigte keine deutlichen Unterschiede zum E4orf3 Wildtyp-Protein. Bei den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden deshalb die Daten der vier Mutanten herausgegriffen, die sich vom Wildtyp-Protein am deutlichsten unterschieden. Bei diesen Mutanten handelt es sich um die aminoterminaler Deletionsmutante N Δ 28 und die Punktmutanten L13A, GG97/98AA und L103A. In Abb. 25 ist die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine dargestellt.

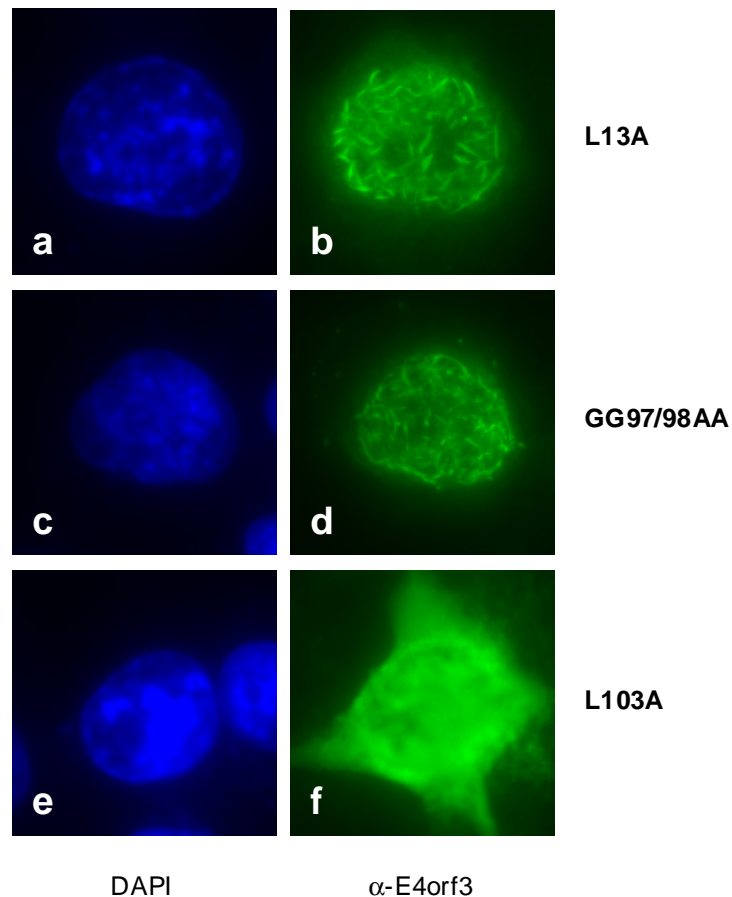


Abb. 25 Expression der E4orf3-Mutanten in H1299-Zellen

H1299-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit je 5,0 µg der Expressionsplasmide pcDNA3-HA E4orf3 L13A, pcDNA3-HA E4orf3 GG97/98AA und pcDNA3-HA E4orf3 L103A nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit dem HA-spezifischen Antikörper 3F10 (1 : 200) inkubiert. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper. (a, c, e) DAPI-Kernfärbung. (b, d, f) FITC-markierte E4orf3-Mutanten. Alle Aufnahmen erfolgten mit einer 1000-fachen Vergrößerung.

Die beiden Mutanten L13A und GG97/98AA waren ähnlich wie das Wildtyp-E4orf3-Protein in elongierten, fibrillären Strukturen lokalisiert. Zudem konnte eine leichte diffuse Verteilung beobachtet werden. Interessanterweise wurden die fibrillären Strukturen bei der Mutante L103A vollständig aufgelöst, wobei das Protein diffus im Zellkern sowie im Zytoplasma vorlag. Dies bedeutet, dass für eine nukleäre Lokalisation von E4orf3 in fädigen Strukturen die Aminosäure Leucin an Position 103 eine wichtige Rolle spielt. Für die Mutante NΔ28 konnte kein Signal detektiert werden.

5.4.2 Untersuchungen zur Transformation der E4orf3-Mutanten

Um Bereiche im E4orf3-Protein zu identifizieren, die für das transformierende Potenzial verantwortlich sind, wurden die E4orf3-Mutanten in Transformationsversuchen getestet (4.4.5; Abb. 26). Nach vier Wochen wurden die entstandenen Zellklone mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt. Die *Foci* aus jeweils einer Schale wurden nicht gefärbt, sondern mit G418 selektioniert, um stabile Zelllinien zu etablieren.

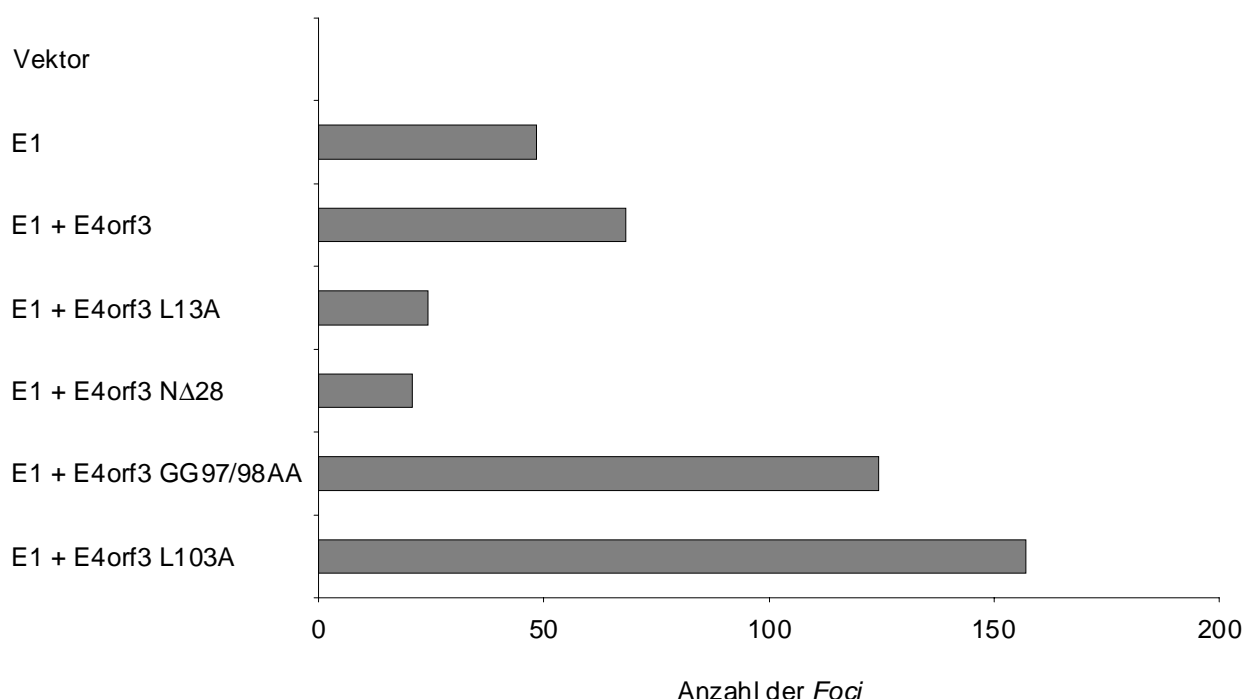


Abb. 26 Transformationsversuche zur Kooperation der E1-Region mit Ad5 E4orf3-Mutanten

Primäre Rattennierenzellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3 (1,0 µg), pXC15 (E1; 5,0 µg), pcDNA3-Ad5 HA E4orf3 (1,0 µg), pcDNA3-HA E4orf3 L13A (1,0 µg), pcDNA3-HA E4orf3 NΔ28 (1,0 µg), pcDNA3-HA E4orf3 GG97/98AA (1,0 µg) und pcDNA3-HA E4orf3 L103A (1,0 µg) nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Die Vektorkontrolle enthält 2,0 µg pcDNA3. Nach vier Wochen wurden die jeweils entstandenen Zellklone ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Mit Hilfe dieser Versuche konnte bestätigt werden, dass Ad5 E4orf3 in Kooperation mit der E1-Region transformierendes Potenzial besitzt. Einen negativen Effekt auf die Transformation zeigten die aminoterminalen E4orf3-Mutanten L13A und NΔ28. Hier konnte man eine Reduktion der *Focus*-Bildung um das Dreifache beobachten.

Bemerkenswerterweise verstärkten die beiden carboxyterminalen Mutanten GG97/98AA und L103A die Bildung von *Foci* um das Zweifache (GG97/98AA) bzw. Dreifache (L103A). Somit spielen sowohl der Amino- als auch der Carboxyterminus des Ad5 E4orf3-Proteins eine Rolle im Transformationsprozess. Aufgrund des negativen Effekts von L13A und NΔ28 sowie dem stark positiven der beiden carboxyterminalen Mutanten GG97/98AA und L103A muss man annehmen, dass der Aminoterminal für das transformierende Potenzial verantwortlich ist. Da beide Mutationen im Carboxyterminus die Transformationsrate gegenüber dem Wildtyp-E4orf3 zusätzlich steigern, besitzt dieser Bereich wahrscheinlich einen negativen Einfluss auf die Transformation.

5.4.3 Untersuchung der E4orf3-Mutanten bezüglich der p300-Interaktion

Nachdem eine Interaktion des E4orf3 Wildtyp-Proteins mit dem Transkriptionskoaktivator p300 gezeigt werden konnte, die möglicherweise mit den transformierenden Eigenschaften von E4orf3 in Zusammenhang steht, wurden Analysen bezüglich der p300-Interaktion mit den verschiedenen E4orf3-Mutanten durchgeführt. Diese umfassten Kollokalisationsstudien sowie In-vitro-Bindungsstudien und Reportergenversuche.

5.4.3.1 Immunfluoreszenzanalysen

Zunächst wurden Immunfluoreszenzanalysen bezüglich einer Interaktion von p300 und den E4orf3-Mutanten durchgeführt (4.3.9; Abb. 27).

Bei diesen Untersuchungen konnte keine Aussage über die aminoterminalen Deletionsmutante E4orf3 NΔ28 gemacht werden, da eine Detektion dieses Proteins nicht möglich war. Mit der Mutante E4orf3 L13A konnte eine Relokalisation des p300-Proteins in fädige Strukturen sowie eine partielle Kollokalisation beider Proteine gezeigt werden. Ebenso war die Mutante E4orf3 GG97/98AA nicht mehr in der Lage p300 vollständig zu relokalisieren. Hier konnte zusätzlich eine diffuse Kernverteilung des Transkriptionskoaktivators beobachtet werden.

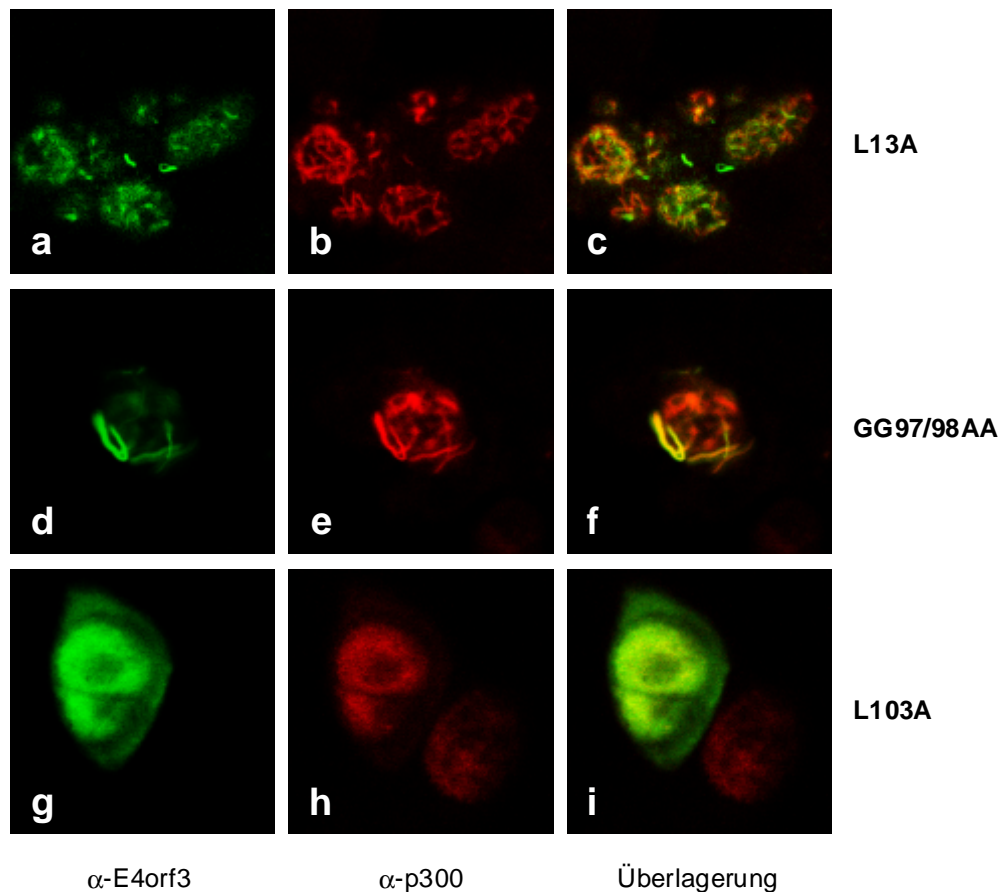


Abb. 27 Immunfluoreszenzanalysen zur Interaktion von p300 mit E4orf3-Mutanten

BRK1-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit 5,0 µg pcDNA3-p300 und je 5,0 µg einer der E4orf3-Mutanten pcDNA3-HA E4orf3 L13A, pcDNA3-HA E4orf3 GG97/98AA und pcDNA3-HA E4orf3 L103A nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit den Antikörpern 3F10 (anti-HA; 1 : 200) und RW128 (anti-p300; 1 : 10) inkubiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (3F10) (**a**, **d**, **g**) sowie einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (RW128) (**b**, **e**, **h**). Die Überlagerung aus beiden Kanälen wird in den Bildern **c**, **f** und **i** gezeigt. Alle Aufnahmen wurden mit einer 1000-fachen Vergrößerung gemacht.

Für E4orf3 L103A wurde bereits beim Expressionsnachweis eine diffuse Verteilung des Proteins in Kern und Zytoplasma gezeigt (5.4.1.2). Demnach wird p300 auch nicht mehr in fibrilläre Strukturen reorganisiert, sondern liegt in einer diffusen Kernverteilung vor. Die leichte Gelbfärbung bei Überlagerung der beiden Bilder kann durch zwei Gründe zustande kommen: (i) Die Mutante L103A ist trotz der diffusen Verteilung in der Lage weiterhin mit p300 zu interagieren, weshalb p300 ebenso diffus verteilt ist oder (ii) sie entsteht eher zufällig, weil L103A nicht mehr an p300 binden kann und so p300 in seiner ursprünglichen diffusen Verteilung vorzufinden ist. Anhand dieser Daten war eine Aussage über Interaktionen von p300

mit den E4orf3-Mutanten noch nicht möglich. Zur weiteren Abklärung wurden deshalb Bindungsstudien durchgeführt.

5.4.3.2 In-vitro-Bindungsstudien

Zunächst wurden die verschiedenen E4orf3-Mutanten mittels des *TNT T7-coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega) nach Angaben des Herstellers *in vitro* translatiert (4.3.1) und anschließend in den *GST-Pulldown* mit den p300-Fusionsproteinen eingesetzt (4.3.3; Abb. 28).

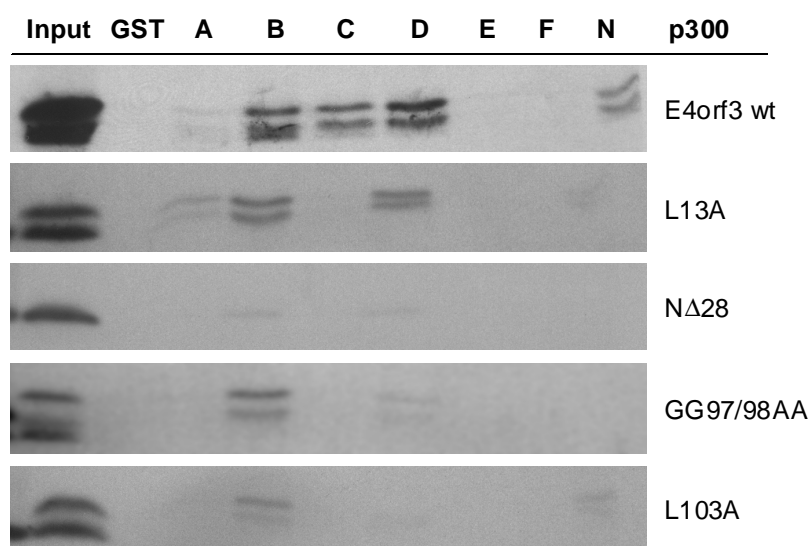


Abb. 28 In-vitro-Bindungsstudien zur Interaktion von p300 und Ad5 E4orf3-Mutanten

Die als GST-Fusionsproteine exprimierten p300-Fragmente wurden mit den *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten E4orf3-Mutanten L13A, NΔ28, GG97/98AA und L103A inkubiert, mehrmals stringent gewaschen und über 15 %ige SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt. Zur Verstärkung der radioaktiven Signale wurde das Gel in *Enlight* (EnerGene) inkubiert und vakuumgetrocknet. Gebundene Proteine wurden mittels Autoradiografie detektiert.

Bei diesen Versuchen konnte ein unterschiedliches Bindungsverhalten der einzelnen E4orf3-Mutanten beobachtet werden. Während das E4orf3 Wildtyp-Protein wie erwartet sehr schwach mit Fragment A und stark mit den Fragmente B, C, D und N von p300 interagiert, konnte dieses Muster bei keiner der untersuchten Mutanten gefunden werden. Keine Bindung konnte für E4orf3 NΔ28 gezeigt werden. Für die zweite aminoterminal Mutante E4orf3 L13A wurde eine sehr schwache Interaktion

mit Fragment A sowie stärkere Interaktionen mit Fragment B und D aufgezeigt. Bei den beiden carboxyterminalen Mutanten konnte eine Bindung mit Fragment B beobachtet werden sowie bei E4orf3 GG97/98AA eine sehr schwache Bindung mit Fragment D. Aufgrund dieser Ergebnisse und den Daten aus der Immunfluoreszenzanalyse muss man annehmen, dass mit Ausnahme von E4orf3 NΔ28 die übrigen Mutanten zumindest teilweise mit p300 wechselwirken können. Um dies auf funktioneller Ebene zu untersuchen wurden Reportergenversuche durchgeführt.

5.4.3.3 Reportergenversuche

Die E4orf3-Mutanten wurden analog zu 5.3.5 bezüglich ihres Einflusses auf die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p300 untersucht. Diese Analysen wurden mit Hilfe des *Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems* (Promega) durchgeführt (4.7; Abb. 29).

Die Untersuchungen zeigten, dass L13A und GG97/98AA ähnlich wie das E4orf3 Wildtyp-Protein einen negativen Einfluss auf die Aktivitäten von p300 nehmen und diese reprimieren. Im Gegensatz dazu sind die beiden Mutanten NΔ28 und L103A nicht in der Lage die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p300 negativ zu modulieren. Hier wurde eher eine - wenn auch schwache - zusätzliche Aktivierung beobachtet.

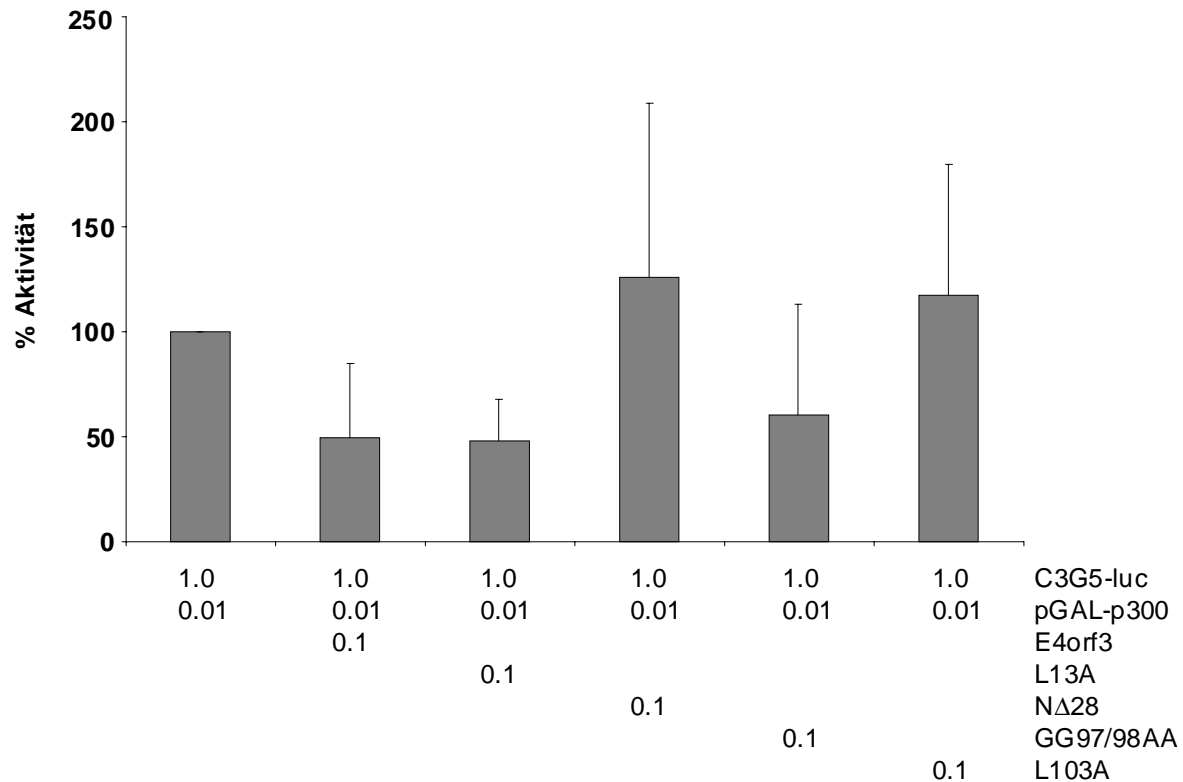


Abb. 29 Einfluss von E4orf3-Mutanten auf die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p300

Es wurden 1×10^5 BRK1-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (*6-well*) ausgesät und am nächsten Tag mit $1,0 \mu\text{g}$ des Reporterplasmids pGL-C3G5-luc und den Effektorplasmiden pG4-p300 ($0,01 \mu\text{g}$), pcDNA3-HA E4orf3 ($0,1 \mu\text{g}$), pcDNA3-HA E4orf3 L13A ($0,1 \mu\text{g}$), pcDNA3-HA E4orf3 NΔ28 ($0,1 \mu\text{g}$), pcDNA3-HA E4orf3 GG97/98AA ($0,1 \mu\text{g}$) und pcDNA3-HA E4orf3 L103A ($0,1 \mu\text{g}$) nach der Liposomen-Methode transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Lysis-Puffer lysiert und die Aktivitäten der einzelnen Konstrukte mit dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) bestimmt. Die Expression des Luziferasereporters mit Koexpression des GAL-p300-Konstruktes wurde quantitativ bestimmt und als Referenzaktivität auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier voneinander unabhängigen Versuchen.

5.5 Etablierung und Charakterisierung transformierter Kaninchenlinsenepithelzellen

Neben den bisherigen Untersuchungen bezüglich der Eigenschaften und Funktionen des E4orf3-Proteins sind genetische und molekulare Analysen des Proteins im Viruskontext von Interesse. Dazu ist die Herstellung und Phänotypisierung von Virusmutanten erforderlich. Zudem konzentrierten sich in den letzten 10 Jahren die Forschungstätigkeiten an humanen Adenoviren überwiegend auf ihre Anwendung

als Vektorsystem in der Gentherapie. Neben den replikationsdefekten Vektoren der ersten (E1⁻, E1/E3⁻), zweiten (E1/E3/E4⁻; zur Übersicht: Benihoud *et al.*, 1999) und dritten (*gutless, high capacity*) Generation (zur Übersicht: Kochanek, 1999a) werden seit einigen Jahren auch konditional replikationskompetente Virusmutanten erprobt (zur Übersicht: Gómez-Navarro und Curiel, 2000). Zur Vermehrung der Virusmutanten werden jedoch Helfer-Zelllinien benötigt, die zum einen für Adenoviren permissiv sind und zum anderen die Aufgaben der mutierten Region in *trans* komplementieren können. Bisher existieren jedoch nur Zelllinien, die konstitutiv die E1-Region (911, 293; (Graham *et al.*, 1977; Whittaker *et al.*, 1984; Gallimore *et al.*, 1986) oder nur die gesamte E4-Region beinhalten (W162; Weinberg und Ketner, 1983). Zelllinien, die neben den Genen der E1-Region nur einzelne Gene der E4-Region beinhalten, um Rekombinationsereignisse möglichst gering zu halten, existieren nur als induzierbare Systeme (Brough *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wären Zelllinien von Interesse, die zusätzlich zu den Genen der E1-Region nur einzelne Genprodukte der E4-Region konstitutiv exprimieren. In der Vergangenheit wurden die transformierenden Eigenschaften von Adenoviren auf der Basis primärer Rattenzellkulturen durchgeführt und aus diesen stabile Zelllinien gewonnen (White und Cipriani, 1990; McLorie *et al.*, 1991; White *et al.*, 1992; Telling und Williams, 1993; van den Heuvel *et al.*, 1993; Teodoro *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996; Teodoro und Branton, 1997). Problematisch ist dabei, dass Rattenzellen für Adenoviren nur semipermissiv sind (Gallimore, 1974), was eine Vermehrung von Virusmutanten erschwert.

Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Dr. Arnd Bunse (Institut für Augenheilkunde, Universität Regensburg) die Beobachtung gemacht werden, dass primäre Kaninchenlinsenepithelzellen für Adenoviren permissiv sind. Daraufhin stellte sich die Frage, ob man aus diesen Linsenepithelzellen mit Hilfe von Transformationsversuchen stabile Helfer-Zelllinien etablieren kann, um weiterführende Analysen zu den adenoviralen Genprodukten E1B, E4orf3 und E4orf6 im Kontext von Virusmutanten machen zu können.

5.5.1 Transformation primärer Kaninchenlinsenepithelzellen

Um der Frage nachzugehen, ob sich aus primären Kaninchenlinsenepithelzellen (RLE-Zellen, *rabbit lens epithelial cells*) stabile Zelllinien etablieren lassen, wurde zunächst ein Transformationsversuch (4.4.5) durchgeführt. Dabei wurden RLE-Zellen mit E1A/E1B und ebenso mit E1A/E1B in Kombination mit E4orf3 und E4orf6 nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Die Plasmidkombinationen sind in Tabelle 4 angegeben.

Im Gegensatz zu den Transformationsversuchen mit Rattenzellen, bei denen bereits nach etwa zwei Wochen erste *Foci* erschienen, wurden in diesem Transformationsversuch mit den Kaninchenlinsenepithelzellen erst nach etwa acht Wochen *Foci* gebildet. Der Versuch wurde nach ca. zehn Wochen beendet und pro Versuchsansatz eine Platte mit Kristallviolett gefärbt (Abb. 30). Die restlichen Platten wurden zur Etablierung von stabilen Zelllinien mit G418 selektioniert. Nachdem eine Transformation von RLE-Zellen möglich war, wurde ein weiterer Transformationsversuch (4.4.5) mit anderen Plasmidkombinationen durchgeführt (Tab. 5). Bei einem Vergleich der *Focus*-Platten von transformierten Rattenzellen und Kaninchenlinsenepithelzellen war ein deutlicher Unterschied der entstandenen *Foci* sichtbar (Abb. 30). Während die adenoviralen Onkogene dichte und vielschichtige *Foci* in Rattenzellen induzieren, ähneln die *Foci* der transfizierten Kaninchenlinsenepithelzellen eher den partiell transformierten, die man bei Transfektionen mit E1A alleine erhält. Da diese Zellen normalerweise nicht in permanente Zelllinien etabliert werden können lag der Verdacht nahe, dass die RLE-Zellen unvollständig transformiert sind und eine Etablierung stabiler Zelllinien nicht möglich ist.

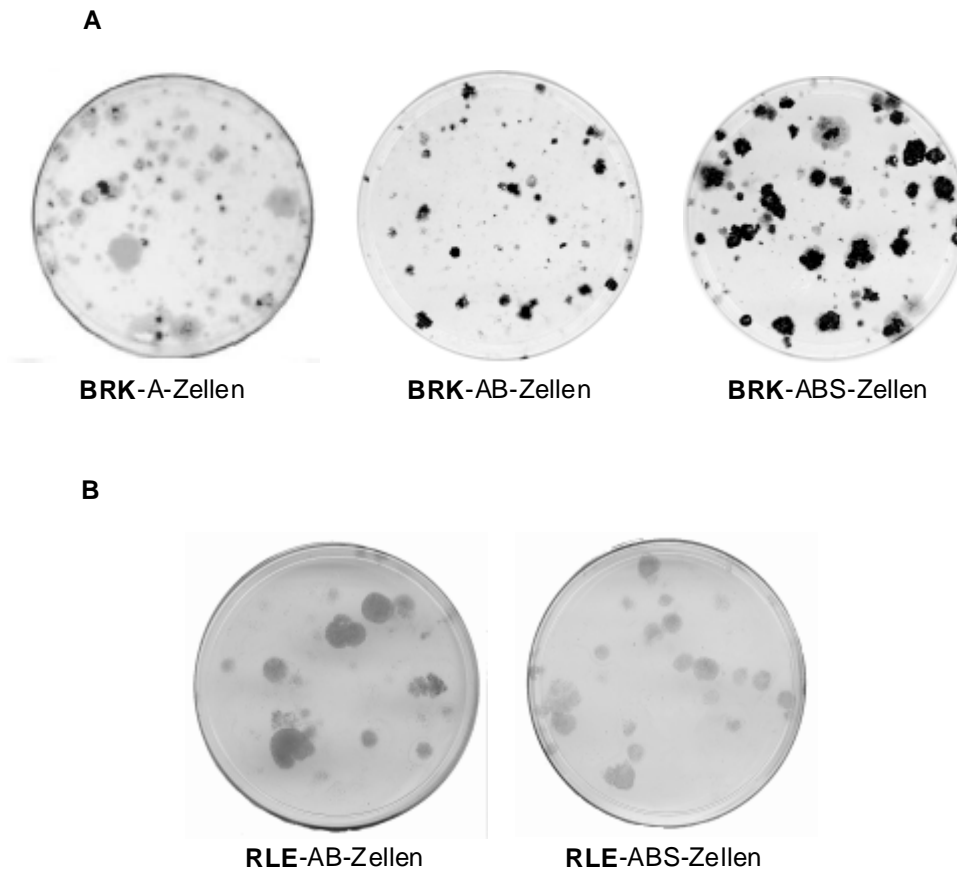


Abb. 30 Vergleich von *Focus*-Platten transformierter Rattenzellen und Kaninchenlinsenepithelzellen

(A) Dargestellt ist eine Kristallviolett-Färbung von *Foci* drei Wochen nach Transfektion primärer Rattennierenzellen mit E1A (BRK-A-Zellen), E1A und E1B (BRK-AB-Zellen) oder mit E1A, E1B und E4orf6 (BRK-ABS-Zellen). (B) Dargestellt ist eine Kristallviolett-Färbung von *Foci* 10 Wochen nach Transfektion primärer Kaninchenlinsenepithelzellen mit E1A und E1B (RLE-AB-Zellen) oder mit E1A, E1B und E4orf6 (RLE-ABS-Zellen).

5.5.2 Etablierung stabil transformierter RLE-Zelllinien

Die aus den oben beschriebenen Transformationsversuchen entstandenen *Foci* wurden zunächst mit G418 selektiert. Danach wurden entweder alle *Foci* einer Zellkulturschale vereinigt (polyklonal) oder mit Hilfe eines Klonierungszyllinders einzelne transformierte Zellklone isoliert (monoklonal) und die Zellen daraus expandiert (4.4.6). Interessanterweise konnten aus allen selektierten *Foci* stabile Zelllinien etabliert werden. Diese werden in nachstehenden Tabellen aufgeführt (Tab. 4 und 5). Es wurde folgende Nomenklatur gewählt: RLEC steht für *rabbit lens*

epithelial cells, A beschreibt das E1A-Genprodukt, B das E1B-Genprodukt, T steht für E4orf 3 (*three*) und S für E4orf 6 (*six*).

BEZEICHNUNG	TRANSFEKTION	EXPRESSION	CHARAKTERISIERUNG
RLEC immortalisiert	pcDNA3 (2,0 µg)	keine	diese Arbeit
RLEC-AB1-2	pcDNA3 (2,0 µg) + pXC15 (5,0 µg)	E1A, E1B	diese Arbeit
RLEC-ABT1-3	pcDNA3 (1,8 µg) + pXC15 (5,0 µg) + pcDNA3-HA E4orf3 (0,2 µg)	E1A, E1B	
RLEC-ABT1-4	pcDNA3 (1,0 µg) + pXC15 (5,0 µg) + pcDNA3-HA E4orf3 (1,0 µg)	E1A, E1B	
RLEC-ABS1-5	pcDNA3 (1,8 µg) + pXC15 (5,0 µg) + pcDNA3-HA E4orf6 (0,2 µg)	E1A, E1B, E4orf6	diese Arbeit
RLEC-ABS1-6	pcDNA3 (1,0 µg) + pXC15 (5,0 µg) + pcDNA3-HA E4orf6 (1,0 µg)	E1A, E1B, E4orf6	diese Arbeit

Tab. 4 Etablierte Kaninchenlinsenepithelzelllinien aus dem ersten Transformationsversuch

BEZEICHNUNG	TRANSFEKTION	EXPRESSION	CHARAKTERISIERUNG
RLEC-2-1	pcDNA3 (2,0 µg)	?	
RLEC-AB2-2	pcDNA3 (2,0 µg) + pE1A (4,0 µg) + pcDNA3-E1B-55 kDa (5,0 µg)	?	
RLEC-ABT2-3	pcDNA3 (1,8 µg) + pE1A (4,0 µg) + pcDNA3-E1B-55 kDa (5,0 µg) + pcDNA3-HA E4orf3 (0,2 µg)	?	
RLEC-ABT2-4	pcDNA3 (1,0 µg) + pE1A (4,0 µg) + pcDNA3-E1B-55 kDa (5,0 µg) + pcDNA3-HA E4orf3 (1,0 µg)	E1A, E1B, E4orf3	diese Arbeit
RLEC-ABS2-5	pcDNA3 (1,8 µg) + pE1A (4,0 µg) + pcDNA3-E1B-55 kDa (5,0 µg) + pcDNA3-HA E4orf6 (0,2 µg)	?	
RLEC-ABS2-6	pcDNA3 (1,0 µg) + pE1A (4,0 µg) + pcDNA3-E1B-55 kDa (5,0 µg) + pcDNA3-HA E4orf6 (1,0 µg)	?	

Tab. 5 Etablierte Kaninchenlinsenepithelzelllinien aus dem zweiten Transformationsversuch

5.5.3 Expressionsnachweis viraler Onkogene in stabil transformierten RLE-Zelllinien

5.5.3.1 *Western Blot*-Analyse

Nach Etablierung der Zelllinien wurden diese bezüglich ihrer Expression der adenoviralen Genprodukte untersucht, wobei es sich bei den im Folgenden charakterisierten RLE-Zelllinien ausschließlich um polyklonale Zellklone handelt. Zu diesem Zweck wurden die ausgewählten RLE-Zelllinien mit Hilfe von *Western Blots* analysiert (4.3.7; Abb. 31). Neben den RLE-Zelllinien wurden zwei Vergleichszelllinien mitgeführt. Bei diesen handelt es sich um die Rattenzelllinie ABS1 und die Zelllinie 911, eine humane embryonale Retinoblastomzelllinie. Beide Zelllinien exprimieren stabil die Genprodukte der E1-Region. BRK-ABS1-Zellen exprimieren zusätzlich E4orf6 (5.1.1).

Während in den primären und immortalisierten RLE-Zellen keine viralen Proteine detektiert werden konnten, wurden in den restlichen Zelllinien unterschiedliche Mengen der E1A-, E1B- und E4-Genprodukte exprimiert. Bei den Zelllinien AB1-2, ABS1-5 und ABS1-6 war eine sehr starke Expression von E1A zu beobachten, während in der Zelllinie ABT2-4 nur ein schwaches Signal zu erkennen war. In allen transformierten Zelllinien wurde E1B nachgewiesen, wobei in den Zelllinien AB1-2 und ABS1-5 große Mengen und in den Zelllinien ABS1-6 und ABT2-4 geringere Mengen exprimiert wurden. E4orf6 konnte nur in der Zelllinie ABS1-6, nicht in der Zelllinie ABS1-5 nachgewiesen werden. Ebenso war es nicht möglich das E4orf3-Genprodukt in der Zelllinie ABT2-4 zu detektieren. In Übereinstimmung mit schon bestehenden Daten zu BRK-ABS1-Zellen (5.1.1), sind die Gleichgewichtsmengen von p53 in den transformierten RLE-Zellen, die große Mengen an E4orf6 exprimieren, aufgrund der E4orf6-induzierten Degradation des Tumorsuppressorproteins erheblich reduziert. Die in den RLE-ABT2-4-Zellen ebenfalls stark reduzierten p53-Mengen beruhen vermutlich auf der sehr schwachen Expression des E1A-Genproduktes und einer damit einhergehenden geringen Akkumulation des Tumorsuppressors.

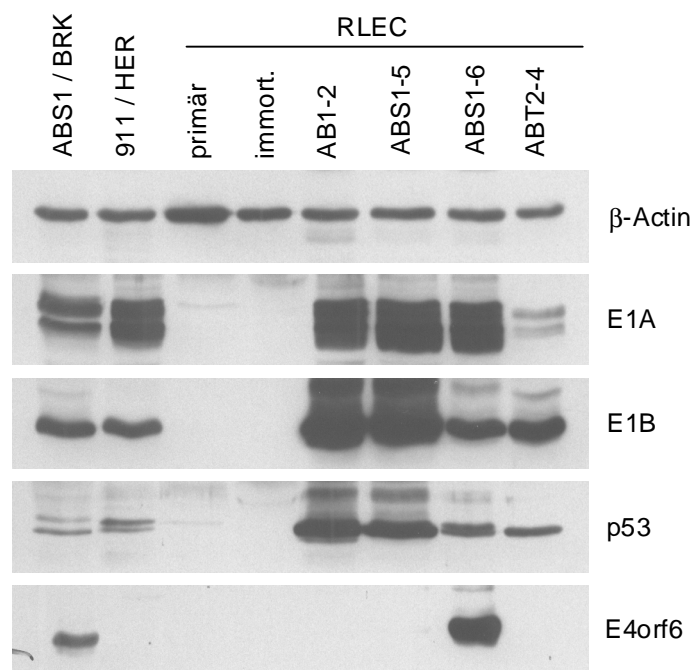


Abb. 31 Expressionsnachweis der adenoviralen Onkogene in etablierten Kaninchenlinsenepithelzelllinien

Je 50 µg Gesamtprotein der einzelnen Zelllinien wurden über 15 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Detektion der Proteine wurde mit folgenden Primärantikörpern durchgeführt: anti-E1A M73; anti-E1B-55 kDa 2A6; anti-p53 DO-1; anti-E4orf6 RSA#3. Das quantitative Laden der Gele wurde mit dem Nachweis des zellulären β-Actin-Proteins (anti-β-Actin AC-15) sichergestellt.

5.5.3.2 Immunfluoreszenzanalysen

Da im *Western Blot* nicht alle viralen Proteine nachgewiesen werden konnten, wurden zum weiteren Expressionsnachweis Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (4.3.9). Damit konnte gleichzeitig die subzelluläre Lokalisation der Proteine in den verschiedenen Zelllinien ermittelt werden (Abb. 32 - 35).

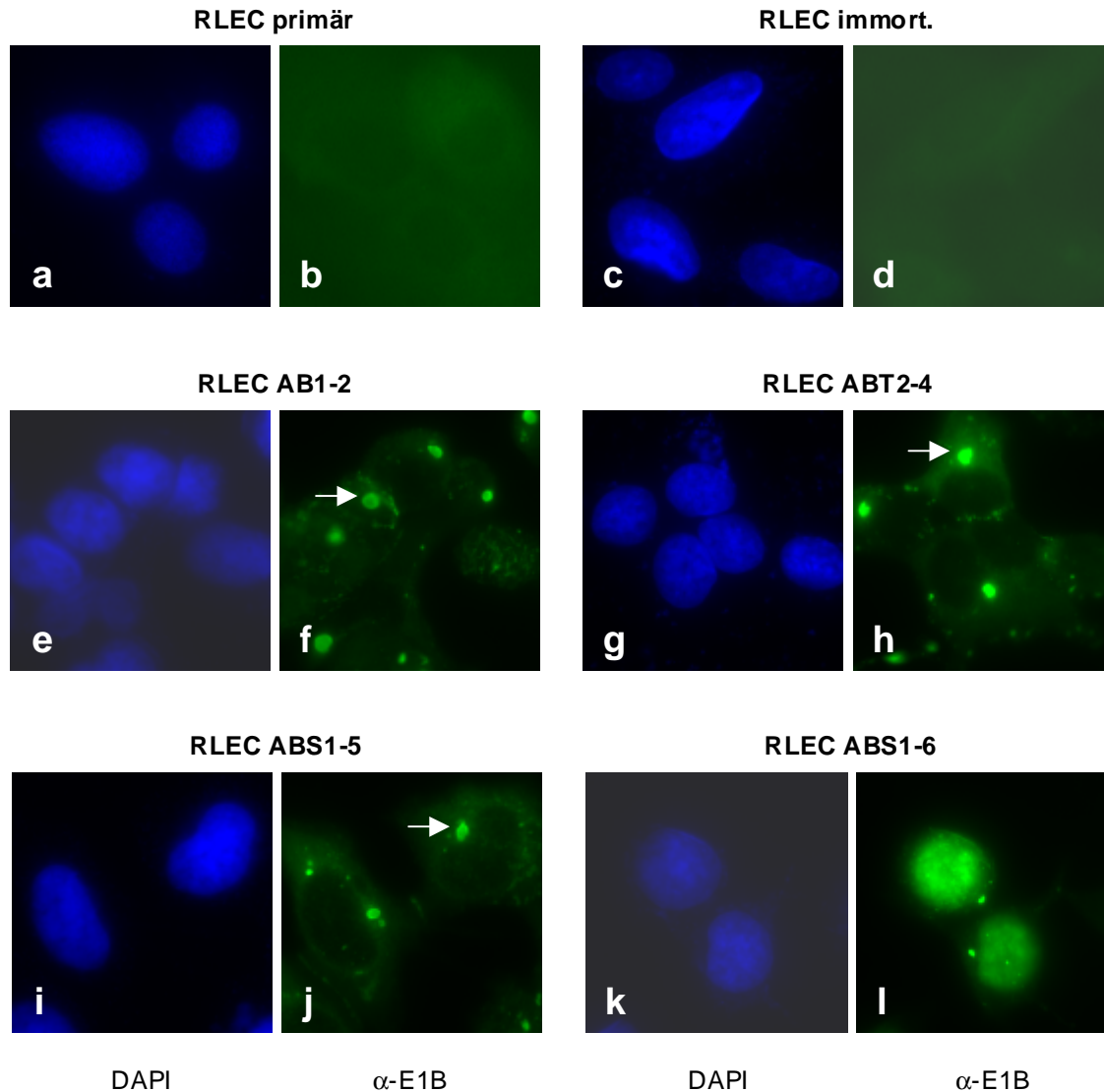


Abb. 32 Immunfluoreszenzanalysen der etablierten RLE-Zelllinien zum Nachweis von E1B 55kDa

Die verschiedenen RLE-Zelllinien wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70 - 80 % mit Methanol fixiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem anti-E1B Antikörper 2A6 (1 : 10). Die Detektion erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. (a, c, e, g, i, k) DAPI-Kernfärbung. (b, d, f, h, j, l) anti-E1B-55 kDa. Die Pfeile markieren exemplarisch *perinuclear bodies*. Alle Aufnahmen wurden mit 1000-facher Vergrößerung gemacht.

In allen mit E1B transfizierten Zellen konnte das E1B-Genprodukt detektiert werden (Abb. 32). Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass das E1B-Protein in den RLE-Zelllinien AB1-2, ABT2-4 und ABS1-5 in zytoplasmatischen *perinuclear bodies* lokalisiert (Abb. 32, f, h, j, Pfeil), die eng mit der Kernmembran assoziiert sind. Im Gegensatz dazu ist E1B-55 kDa bei Zellen, die große Mengen an E4orf6 exprimieren im Kern konzentriert. Diese Beobachtung konnte bisher ausschließlich bei humanen

oder Affenzellen gemacht werden (Goodrum *et al.*, 1996), was zu der Annahme führte, dass E4orf6 E1B 55 kDa durch einen für Primaten spezifischen Faktor im Kern zurückhält.

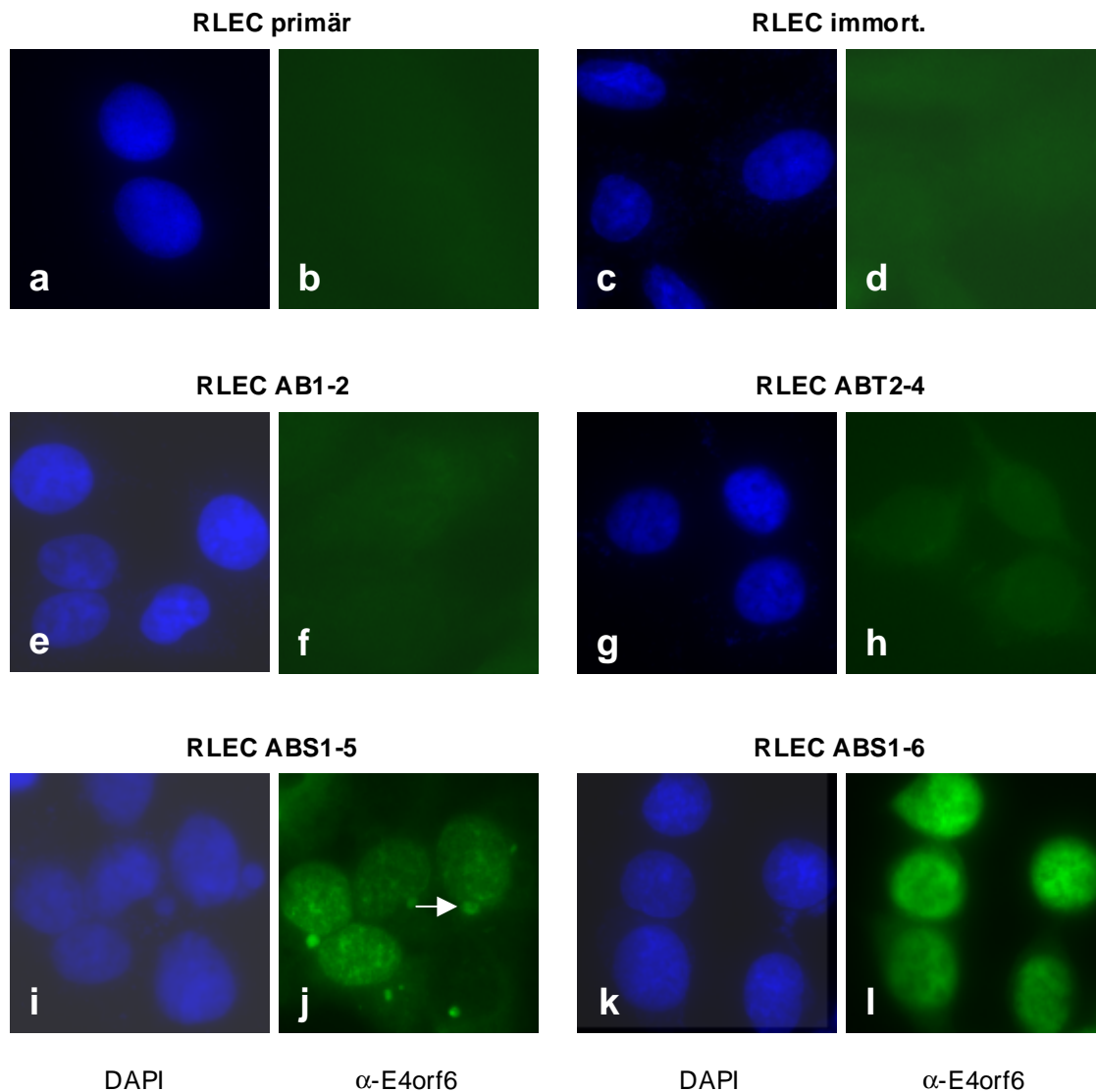


Abb. 33 Immunfluoreszenzanalysen der etablierten RLE-Zelllinien zum Nachweis von E4orf6

Die verschiedenen RLE-Zelllinien wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70 - 80 % mit Methanol fixiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem anti-E4orf6 Antikörper RSA#3 (1 : 10). Die Detektion erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. (a, c, e, g, i, k) DAPI-Kernfärbung. (b, d, f, h, j, l) anti-E4orf6. Der Pfeil markiert exemplarisch einen *perinuclear body*. Alle Aufnahmen wurden mit 1000-facher Vergrößerung gemacht.

Die großen Mengen an E4orf6 in RLE-ABS1-6-Zellen, die schon im *Western Blot* detektiert wurden, konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalysen bestätigt

werden. Zusätzlich konnte hier das E4orf6-Protein auch in der RLE-Zelllinie ABS1-5 nachgewiesen werden (Abb. 33, j), wenn auch mit einem deutlich schwächeren Signal. Jedoch konnte man hier zusätzlich eine Lokalisation in *perinuclear bodies* erkennen (Abb. 33, j, Pfeil). Die diffuse Lokalisation des Proteins im Zellkern stimmt aber mit bisherigen Ergebnissen anderer humaner Zellen bzw. Rattenzelllinien überein (Goodrum *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999a; Orlando und Ornelles, 1999).

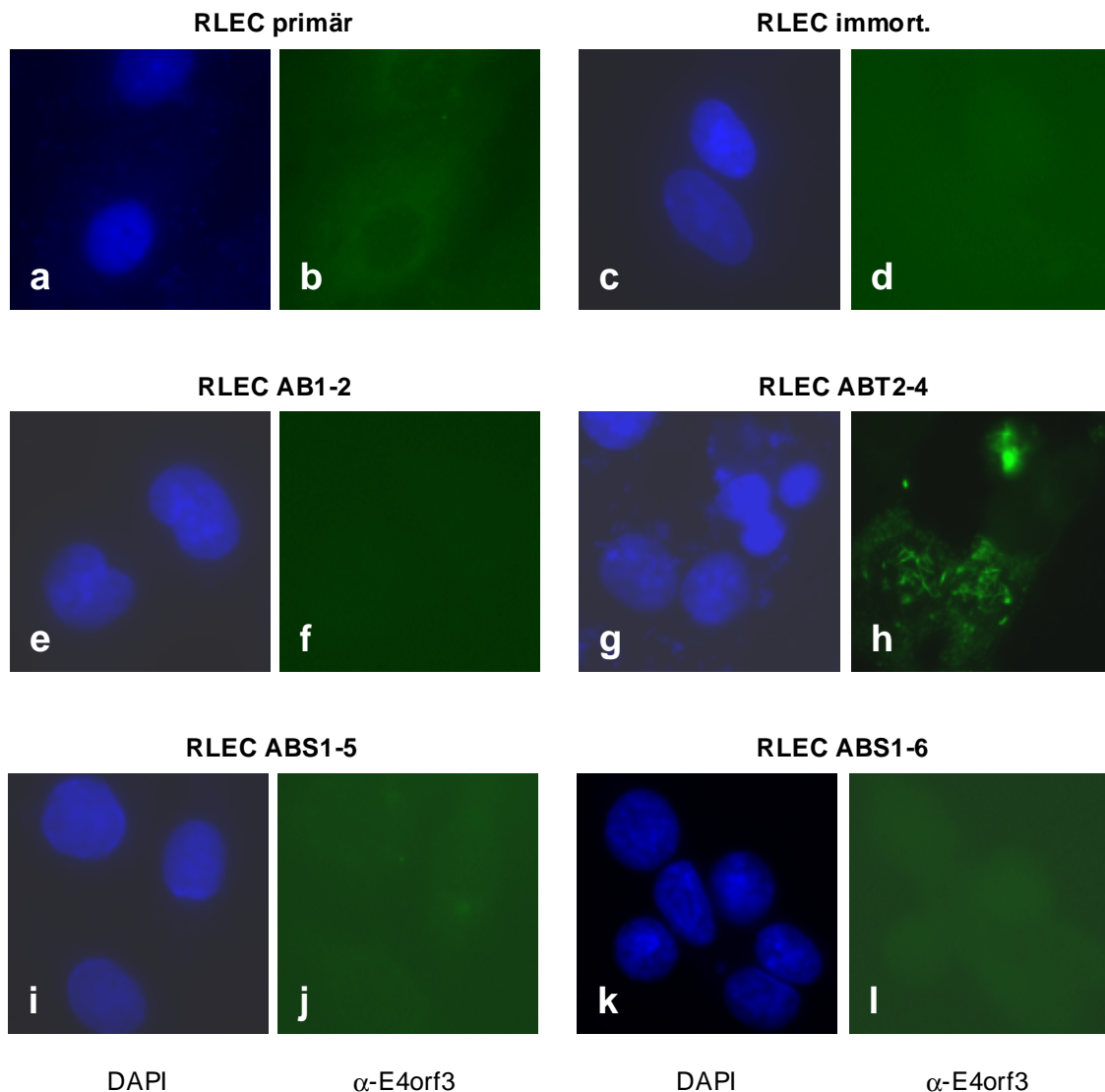


Abb. 34 Immunfluoreszenzanalysen der etablierten RLE-Zelllinien zum Nachweis von E4orf3

Die verschiedenen RLE-Zelllinien wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70 - 80 % mit Methanol fixiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem anti-E4orf3 Antikörper 6A11 (1 : 10). Die Detektion erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper. (a, c, e, g, i, k) DAPI-Kernfärbung. (b, d, f, h, j, l) anti-E4orf3. Alle Aufnahmen wurden mit 1000-facher Vergrößerung gemacht.

Weiterhin war es mit Hilfe dieser Analysen möglich das E4orf3-Protein in der RLE-Zelllinie ABT2-4 zu detektieren (Abb. 34, h). Dabei war das Protein in elongierten, fibrillären Strukturen lokalisiert. Die Ausbildung dieser *nuclear tracks* wurde bisher nur bei humanen, mit Adenovirus-infizierten Zellen oder transient transfizierten humanen oder Rattenzellen beobachtet (Carvalho *et al.*, 1995; Leppard und Everett, 1999; Täuber und Dobner, 2001b). Bei stabil etablierten Rattenzelllinien werden diese Strukturen nur in sehr frühen Passagen ausgebildet (Michael Nevels, persönliche Mitteilung). In späteren Passagen ist E4orf3 in eher punktförmigen Kompartimenten lokalisiert (Nevels *et al.*, 1999b).

Zusätzlich zu den viralen Proteinen wurde auch die Expression und Lokalisation des Tumorsuppressors p53 mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse überprüft (Abb. 35). Die Untersuchungen zeigten, dass in einigen der immortalisierten RLE-Zellen p53 detektiert werden kann, wobei es eine diffuse Kernverteilung einnimmt. Während das Tumorsuppressorprotein in den RLE-AB1-2-Zellen in großen perinukleären Komplexen zu finden war (Abb. 35, f, Pfeil), konnte es in RLE-ABT2-4- und RLE-ABS1-6-Zellen infolge niedriger Gleichgewichtsmengen nur in kleineren, derartigen Strukturen detektiert werden (Abb. 35, h, l, Pfeil). Diese Ergebnisse stimmen mit Daten aus Untersuchungen mit stabilen Rattenzelllinien überein (Nevels, 1999; Nevels *et al.*, 1999a). Im Vergleich zu stabilen Rattenzellen können bei den RLE-Zelllinien ABT2-4 und ABS1-5 Abweichungen in der Lokalisation von p53 beobachtet werden. In RLE-ABS1-5-Zellen wurde mittels *Western Blot*-Analyse p53 in sehr großen Mengen nachgewiesen. Diese Mengen konzentrieren sich jedoch nicht wie bei AB-Zellen in großen perinukleären Komplexen, sondern sind neben kleineren *perinuclear bodies* zusätzlich in punktförmigen Kompartimenten verteilt. Diese punktförmigen Strukturen sind ebenfalls in RLE-ABT2-4-Zellen detektierbar. Bisher konnte p53 in E4orf6-exprimierenden, transformierten Rattenzellen ausschließlich in perinukleären Komplexen detektiert werden (Nevels, 1999). Bei BRK-ABT-Zellen war p53 zwar zusätzlich zu den *perinuclear bodies* auch diffus im Zellkern zu finden, jedoch nie in punktförmigen Strukturen (Nevels, 1999).

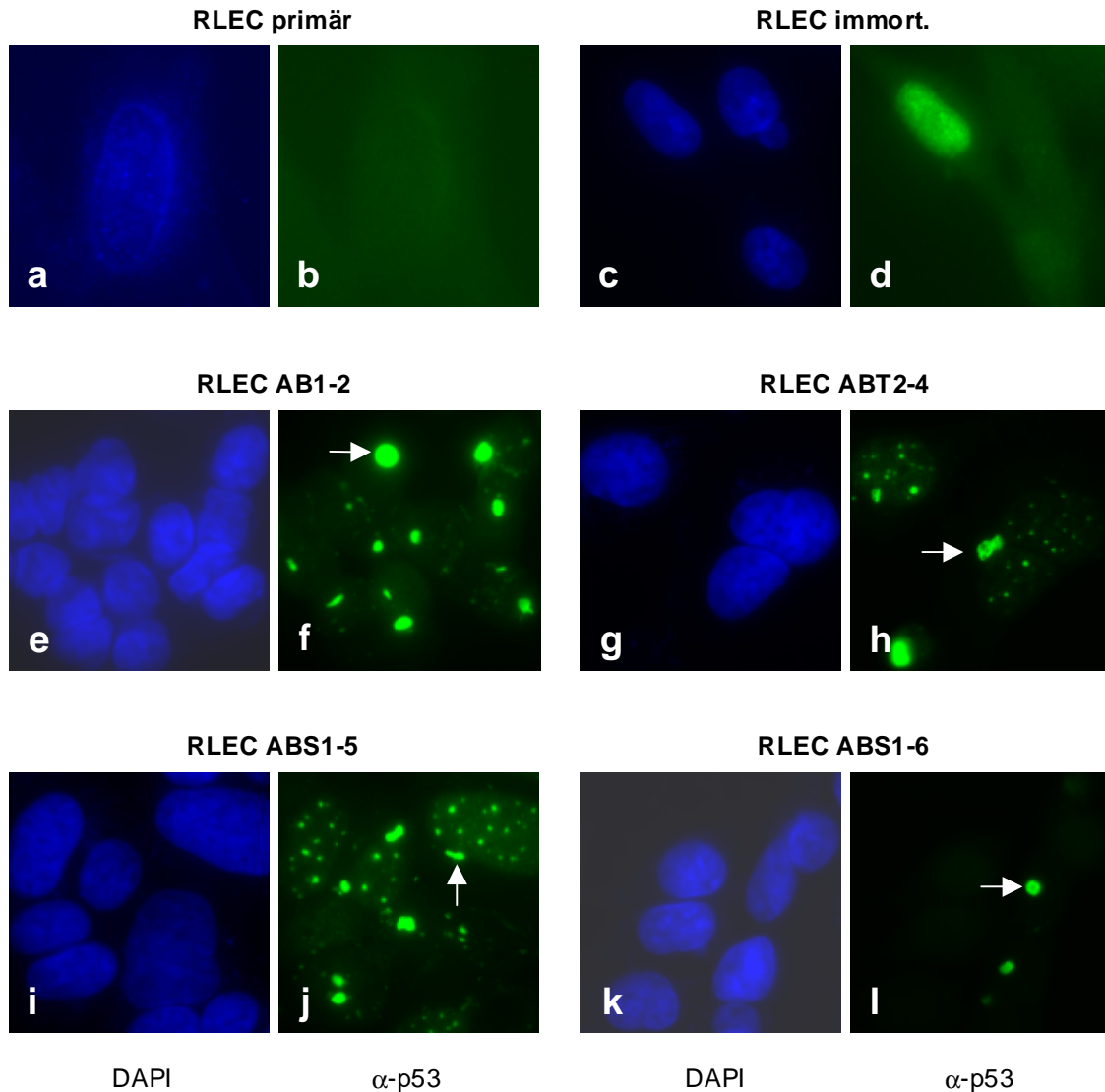


Abb. 35 Immunfluoreszenzanalysen der etablierten RLE-Zelllinien zum Nachweis von p53

Die verschiedenen RLE-Zelllinien wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70 - 80 % mit Methanol fixiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem anti-p53 Antikörper DO-1 (1 : 200). Die Detektion erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. (a, c, e, g, i, k) DAPI-Kernfärbung. (b, d, f, h, j, l) anti-p53. Die Pfeile markieren exemplarisch *perinuclear bodies*. Alle Aufnahmen wurden mit 1000-facher Vergrößerung gemacht.

Zusätzlich wurde E1A mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen in allen transfizierten Zellen in einer diffusen Kernverteilung nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

5.5.4 Interaktion von E4orf3 mit den POD-Strukturen in stabil transformierten RLE-Zelllinien

Es wurde sowohl für Adenovirus-infizierte Zellen als auch für stabil transformierte Rattenzellen gezeigt, dass die POD-Strukturen umorganisiert werden und dass dabei das E4orf3-Protein mit dem POD-Protein PML kolokalisiert. Nachdem das E4orf3-Genprodukt in den RLE-Zellen ebenfalls in fibrillären Strukturen vorliegt, war es von Interesse, ob in diesen Strukturen auch das PML-Protein nachgewiesen werden kann. Aus diesem Grund wurden Kolokalisationsstudien durchgeführt (4.3.9; Abb. 36). Als Vergleichszelllinie wurde AB1-2 mitgeführt, die kein E4orf3 exprimiert und somit auch keine Umstrukturierung der PODs aufzeigen sollte.

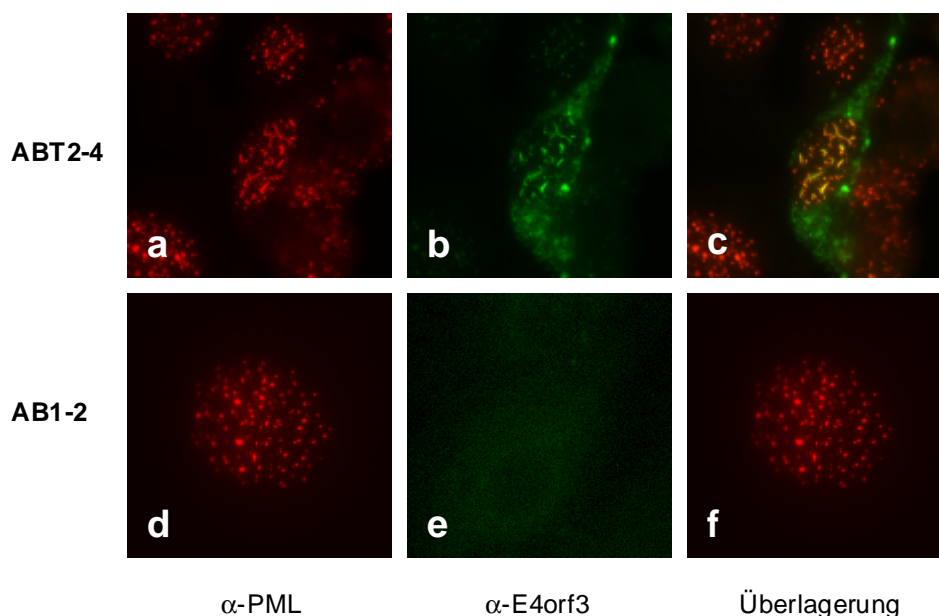


Abb. 36 Kolokalisation von E4orf3 mit PML und Reorganisation der PODs in transformierten RLE-Zelllinien

RLE-ABT2-4-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % mit Methanol fixiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit dem E4orf3-spezifischen Antikörper 6A11 (1 : 10) und dem PML-spezifischen Antikörper 5E10 (1 : 10). 5E10 wurde mit einem *Texas Red*-markierten anti-Maus-Antikörper detektiert (a, d), 6A11 mit einem FITC-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (b, e). Die Bilder c und f zeigen die Überlagerung beider Kanäle. Alle Aufnahmen erfolgten mit 1000-facher Vergrößerung.

Während in den AB1-2-Zellen die PODs als punktförmige Strukturen im Zellkern vorliegen, findet in ABT2-4-Zellen eine Reorganisation dieser Kompartimente in

fibrilläre Strukturen statt. Weiterhin ergibt sich bei Überlagerung der beiden Kanäle eine Kolokalisation von E4orf3 mit dem POD-Protein PML (Abb. 36, c). Auffällig ist hier eine zusätzliche Lokalisation von E4orf3 im Zytoplasma. Diese Beobachtung konnte bisher nur in infizierten humanen Zellen gemacht werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass die durch E4orf3 herbeigeführte Reorganisation der PODs in Kaninchenlinsenepithelzellen mit bisherigen Daten von Adenovirus-infizierten humanen Zellen übereinstimmt (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Leppard und Everett, 1999; Täuber und Dobner, 2001b). Im Gegensatz dazu konnte in E4orf3-exprimierenden Rattenzelllinien trotz einer Kolokalisation von E4orf3 mit PML keine Reorganisation der PODs in fibrilläre Strukturen beobachtet werden (Nevels *et al.*, 1999b).

Insgesamt zeigen die bisherigen Untersuchungen, dass sich Kaninchenlinsenepithelzellen, wenn auch schwerer als Rattenzellen, mit adenoviralen Onkogenen transformieren lassen. Obwohl sich die entstandenen *Foci* deutlich von den *Foci* transformierter Rattenzellen unterschieden, war eine Etablierung von stabilen Zelllinien möglich. Die adenoviralen Genprodukte konnten in allen transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich zur Expression wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen die Lokalisation der einzelnen Proteine untersucht, wobei sich deutliche Unterschiede zu den stabilen Rattenzelllinien zeigten und Ähnlichkeiten zu humanen Zellen zu beobachten waren. Somit konnten erstmals stabile Kaninchenzelllinien etabliert werden, die zusätzlich zur E1-Region stabil E4orf3 oder E4orf6 exprimieren. Im Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation der viralen Proteine zeigten sie Eigenschaften, die denen humaner Zellen sehr ähneln. Damit sind erste Voraussetzungen gegeben, um eine Vermehrung von Virusmutanten zu gewährleisten, die im E4orf3- oder E4orf6-Gen Mutationen beinhalten. Zur weiteren Charakterisierung der etablierten RLE-Zelllinien wurden Untersuchungen bezüglich der Morphologie und Wachstumseigenschaften durchgeführt.

5.5.5 Morphologische Veränderungen stabil transformierter RLE-Zelllinien

Bei diesen Untersuchungen war von Interesse, ob die RLE-Zelllinien zusätzliche Merkmale stabil transformierter Zellen aufweisen. So verändert sich beim Übergang

in den transformierten Zustand die Form der Zellen, wobei sie ihren epitheloiden oder fibroblastenartigen Charakter verlieren und eine überwiegend kugelhähnliche Gestalt annehmen. Dafür verantwortlich ist die mit der Transformation einhergehende Veränderung des Zytoskeletts (zur Übersicht: Modrow und Falke, 1997).

Um die Morphologie der etablierten RLE-Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 60 % im Phasenkontrast analysiert (4.4.10; Abb. 37).

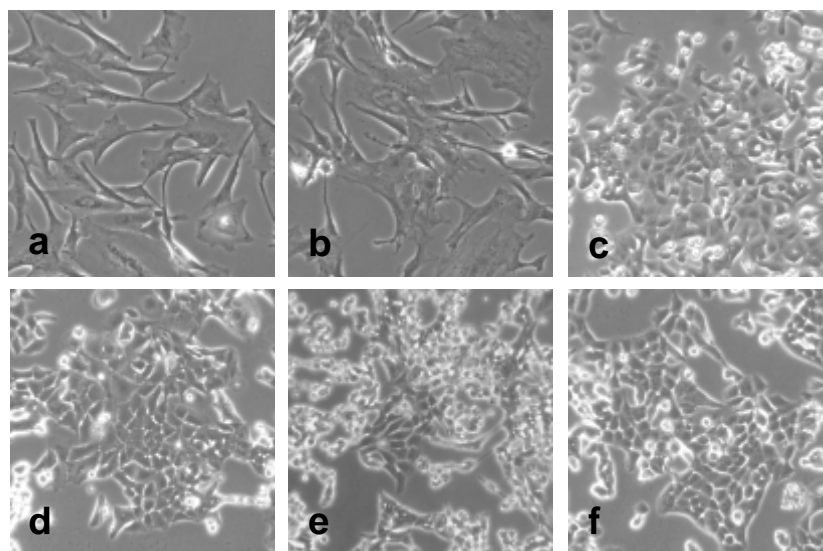


Abb. 37 Morphologie unterschiedlich transformierter RLE-Zelllinien

RLE-Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 60 % im Phasenkontrast mit 100-facher Vergrößerung fotografiert. (a) primäre RLE-Zellen; (b) immortalisierte RLE-Zellen; (c) RLE-AB1-2-Zellen; (d) RLE-ABS1-5-Zellen; (e) RLE-ABS1-6-Zellen; (f) RLE-ABT2-4-Zellen.

Im Gegensatz zu den primären und immortalisierten RLE-Zellen, die ein epitheloides und fibroblastenartiges Aussehen aufweisen, zeigen die transformierten Zelllinien AB1-2, ABT2-4, ABS1-5 und ABS1-6 eine sehr viel kleinere und kugelhähnliche Gestalt. Im mikroskopischen Vergleich der transformierten Zellen erschienen die Zellen, die neben E1A und E1B große Mengen an E4orf6 exprimieren wesentlich kleiner als die Zellen, die nur die E1-Proteine (AB1-2) oder zusätzlich E4orf3 (ABT2-4) und E4orf6 in sehr geringen Mengen (ABS1-5) enthalten.

5.5.6 Veränderungen der zellulären Wachstumseigenschaften *in vitro*

Neben den morphologischen Veränderungen unterscheiden sich *in vitro* transformierte Zellen von normalen Zellen in ihrem Wachstumsverhalten. Dazu gehören beschleunigte Zellteilung, Wachstum zu hohen Dichten sowie serum- und oberflächenunabhängige Proliferation.

Um das Wachstumsverhalten der transformierten RLE-Zellen zu ermitteln wurde über einen Zeitraum von knapp drei Wochen eine Wachstumskurve erstellt (4.4.9; Abb. 38).

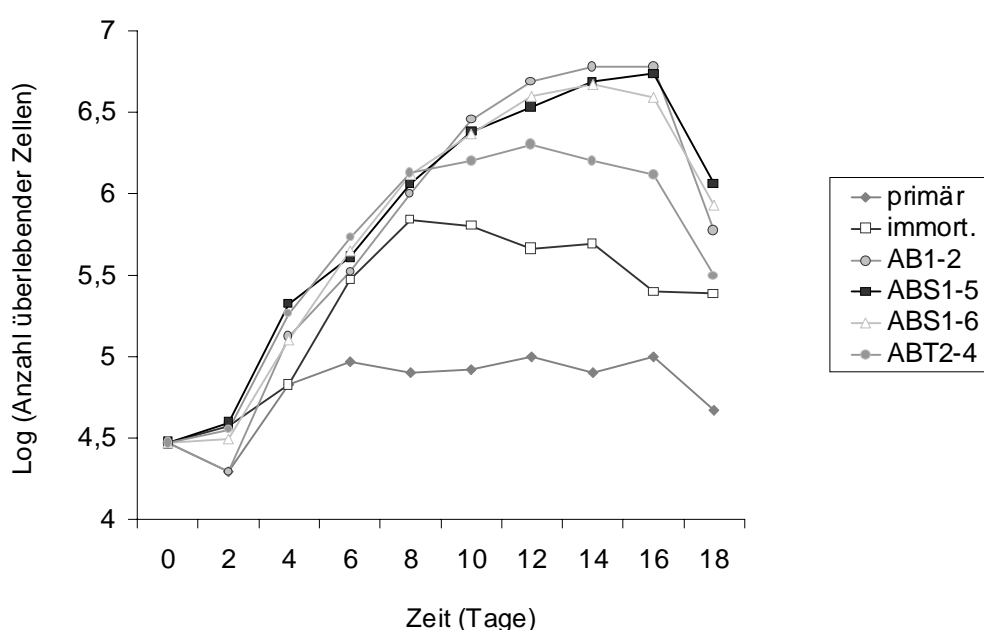


Abb. 38 Wachstumskurven für primäre, immortalisierte und transformierte RLE-Zellen

3×10^4 Zellen der einzelnen RLE-Zelllinien wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well) ausgesät und alle 48 h ausgezählt, um die Anzahl der überlebenden Zellen zu ermitteln. Gezeigt ist der Logarithmus überlebender Zellen aus jeweils zwei Vertiefungen.

Dabei konnte beobachtet werden, dass sowohl die primären als auch die immortalisierten RLE-Zellen bereits nach ca. 6 – 8 Tagen ihre maximale Konfluenz erreichten und ihr Wachstum einstellten. Jedoch erlangten die immortalisierten Zellen im gleichen Zeitraum eine doppelt so hohe Dichte wie die primären Zellen. Aufgrund der geringen Zelldichte im Vergleich zu den transformierten Zelllinien, und dem regelmäßigen Austausch des Mediums kam es nicht zum raschen

Absterben der Zellen. Während die Zelllinie ABT2-4 nach etwa 12 Tagen die maximale Dichte erreichte, erlangten die Zelllinien AB1-2, ABS1-5 und ABS1-6 ihre maximale Konfluenz erst nach 18 Tagen, was zu einer starken Ansäuerung des Mediums und einem Absterben der Zellen führte. Im Allgemeinen zeigten die letzten drei Zelllinien ein fast identisches Wachstumsverhalten. Mit diesen stark gesteigerten Wachstumsraten und höheren Sättigungsdichten der transformierten gegenüber den primären Zellen ist neben den morphologischen Veränderungen ein weiteres Merkmal vollständig transformierter Zellen gegeben.

5.5.7 Induzierte Steigerung von Tumorigenität und malignen Tumorstadium *in vivo*

5.5.7.1 Nacktmausversuche

Da die RLE-Zelllinien alle charakteristischen Eigenschaften onkogen transformierter Zellen *in vitro* aufweisen, wurden sie in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Thilo Spruß (Zentrale Tierlaboratorien der Universität Regensburg) auf ihre Fähigkeit zur Tumorentstehung *in vivo* untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Zellen in NMRI(*nu/nu*)-Nacktmäuse injiziert, die durch eine fehlende Thymusdrüse nicht zu T-Zell-abhängigen Abstoßungsreaktionen fähig sind. Die Tiere wurden dann in wöchentlichen Abständen für eine Gesamtdauer von acht Wochen auf Tumorbildung untersucht und die Tumordurchmesser bestimmt. Zum Vergleich wurde eine schon getestete Rattenzelllinie (ABS1) mitgeführt, die eine sehr starke Tumorbildung in Nacktmäuse induziert (Tab. 6; Nevels *et al.*, 1999a).

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass während des Beobachtungszeitraums alle RLE-Zelllinien, die mit den adenoviralen Onkogenen transformiert wurden, auch in Nacktmäuse Tumoren erzeugten. Wie erwartet wurden nach Injektion von primären als auch immortalisierten RLE-Zellen keine Tumoren in den Versuchstieren festgestellt. Bereits nach acht Tagen entwickelten die ersten Nacktmäuse, im Versuchsverlauf schließlich sechs Versuchstiere, denen RLE-AB1-2 und BRK-ABS1-Zellen injiziert wurden, tastbare Tumoren. Ebenso wurde in der RLE-ABS1-6-Versuchsgruppe in jedem der untersuchten Tiere ein Tumor induziert, jedoch mit einer Latenz von 15 Tagen. Im Vergleich dazu entwickelten drei von vier Mäusen

nach Inokulation von RLE-ABT2-4-Zellen sowie vier von fünf Versuchstieren nach Injektion von RLE-ABS1-5-Zellen tastbare Tumoren. Dabei betrug die Latenz bei der RLE-ABT2-4-Versuchsgruppe 15 Tage, die der RLE-ABS1-5-Versuchsgruppe 22 Tage. Jeweils ein (RLE-ABS1-5) bzw. zwei (RLE-ABT2-4) Versuchstiere starben aufgrund unbekannter Ursache im Laufe des Versuches. Interessanterweise entwickelten die Versuchsgruppen, denen BRK-ABS- bzw. RLE-ABS-Zellen injiziert wurden auch die größten Tumoren. Dies bestätigt Ergebnisse aus In-vitro-Versuchen, die zeigten dass die Kooperation der adenoviralen E1-Region mit dem E4orf6 Genprodukt eine gesteigerte Tumorigenität hervorruft (Nevels *et al.*, 1999a). Dabei ist jedoch anzumerken, dass die maximale Tumorfläche bei BRK-ABS1-Zellen bereits nach drei Wochen, bei den RLE-ABS-Zelllinien nach acht Wochen erreicht wurde. Außerdem induzierten RLE-ABT2-4-Zellen im Vergleich zu RLE-AB1-2-Zellen Tumoren mit einer nahezu doppelten durchschnittlichen Tumorfläche. Dies bestätigt wiederum Ergebnisse aus In-vitro-Versuchen, die auf eine Kooperation von E4orf3 mit den Genprodukten der E1-Region im Transformationsprozess hindeuten.

ZELLINIE	ANZAHL DER MÄUSE MIT TASTBAREM TUMOR / GESAMTE ANZAHL DER TIERE	LATENZ (TAGE)	MITTELWERT DER TUMORFLÄCHE mm ² ± SD
BRK-ABS1	6/6	8	98,67 ± 63,43
RLE primär	0/6		
RLE immortalisiert	0/6		
RLE-AB1-2	6/6	8	15,18 ± 15,18
RLE-ABT2-4	3/4 ^a	15	27,3 ± 27,3
RLE-ABS1-5	4/5 ^a	22	49,5 ± 45,47
RLE-ABS1-6	6/6	15	93,5 ± 54,27

Tab. 6 Tumorigenität von RLE-Zelllinien in Nacktmäusen im Vergleich zu BRK-ABS1-Zellen

Jeweils sechs NMRI(*nu/nu*)-Mäuse wurden mit je 1×10^6 Zellen der angegebenen Zelllinie inokuliert und regelmäßig auf Anwesenheit solider, tastbarer Tumoren untersucht. Angegeben ist jeweils die Anzahl von Tumor-positiven Mäusen pro Gesamtzahl von Versuchstieren. Latenz gibt die Zeitspanne von der Inokulation der Zellen bis zum ersten Auftreten von Tumoren an. In der letzten Spalte sind die Mittelwerte der Tumorflächen und deren Standardabweichung angegeben.

^a ein Teil der Versuchstiere ist aus unbekannten Gründen verstorben

5.5.7.2 Histologische Untersuchungen

Nach Beendigung des Nacktmausversuches wurde pro Versuchsgruppe ein Tumor entnommen und histopathologisch untersucht (4.6; Abb. 39).

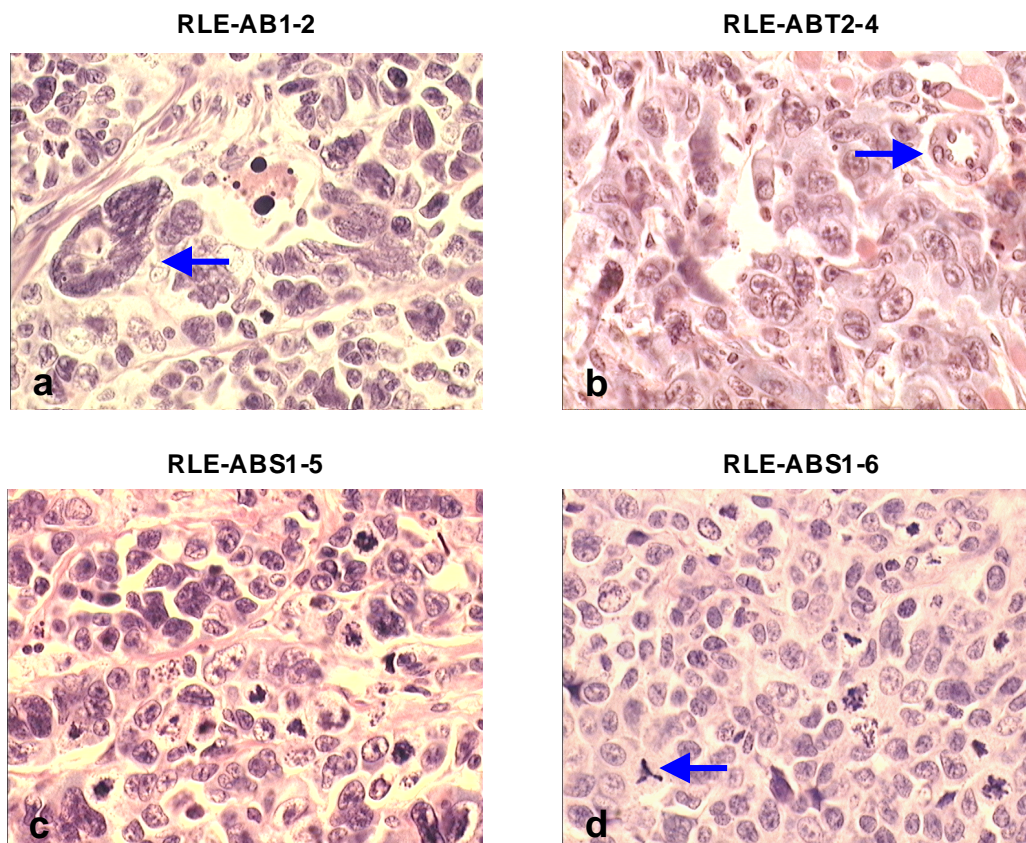


Abb. 39 Histologie von Tumoren induziert durch RLE-AB1-2, RLE-ABT2-4, RLE-ABS1-5 und RLE-ABS1-6

Pro Versuchsgruppe wurde je einem Tier ein Tumor entnommen und davon ein histologischer Gewebeschnitt angefertigt. Die Schnitte wurden nach der Hämatoxylin-Eosin-Färbemethode angefärbt. Die Pfeile markieren typische Merkmale maligner Tumoren: (a) vielkernige Tumorzelle; (b) Gefäß, das den Tumor durchzieht→vitaler, gut vaskularisierter Tumor; (c) tripolare Teilungsspindel. Die Aufnahmen erfolgten mit 100-facher Vergrößerung.

Im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen, die zeigten, dass ABS-induzierte Tumoren, im Vergleich zu AB-induzierten Tumoren aggressiver wachsen, belegen die hier gezeigten Gewebeschnitte, dass ABS-induzierte Tumoren auch nach histopathologischen Kriterien eine höhere Malignität besitzen. RLE-AB1-2-Tumoren zeigen die häufig vielkernigen Tumorzellen (Abb. 39 a, Pfeil), die nach den bisherigen Beobachtungen ein Merkmal von eher langsam wachsenden Tumoren

sind. Weiterhin sind stromale Anteile, die das Tumorgewebe durchziehen sowie kleinere und größere Areale nekrotischen Gewebes zu erkennen. Dagegen zeigt sich bei den beiden ABS-induzierten Tumoren ein sehr vitales Tumorgewebe mit äußerst geringem stromalen Anteil und wenig Nekrosen (Abb. 39 c, d). Der Zellverband ist sehr mitosereich, wobei die vielen unregelmäßigen Metaphaseplatten und tripolare Teilungsspindeln (Abb. 39 d, Pfeil) auf einen äußerst malignen Phänotyp hinweisen. Die Tumorzellen zeichnen sich weiterhin durch äußerst polymorphe sowie polychromatische Kerne mit ein bis drei prominenten Nukleoli aus. Im Unterschied zum ABS1-6-induzierten Tumor zeigt der ABS1-5-induzierte Tumor mehr stromale Anteile. Der Gewebeschnitt des ABT2-4-induzierten Tumors zeigt einen vitalen, gut vaskularisierten Tumor (Abb. 39 b, Pfeil) mit wenig stromalen Anteilen. Im Gegensatz zu den ABS-Tumoren findet man hier deutlich weniger Zellen in der Metaphase.

Insgesamt zeigen diese In-vivo-Studien, dass transformierte Kaninchenlinsenepithelzellen zusätzlich zu den morphologischen Veränderungen und gesteigerten Wachstumsraten ein weiteres Merkmal vollständig onkogen transformierter Zellen aufweisen. Dabei induzieren E4orf6-exprimierende RLE-Zellen schnell wachsende, hochgradig maligne Tumoren, die mit BRK-ABS-induzierten Tumoren vergleichbar sind.

Somit wurde mit den Kaninchenlinsenepithelzellen ein neues System zur Untersuchung von Funktionen und Eigenschaften adenoviraler Proteine entwickelt. Zusätzlich bieten die transformierten RLE-Zelllinien erstmals die Möglichkeit E1- und/oder E4-defekte Virusmutanten präparativ zu hochtitrigen Virusstocks zu vermehren (Peter Groitl und Dagmar Büchner, persönliche Mitteilung).

6.1 Mechanismen Adenovirus-vermittelter Onkogenese

Nach heutigem Wissensstand wird die vollständige Transformation Adenovirus-infizierter Zellen durch das Zusammenwirken mehrerer Genprodukte der frühen Transkriptionseinheiten E1A, E1B und E4 vermittelt. Als weitere Faktoren werden genetische und epigenetische Veränderungen diskutiert, die infolge der viralen DNA-Integration auftreten (zur Übersicht: Dörfler, 1996). Nach einem einfachen Modell induzieren die E1A-Proteine die Immortalisierung primärer Zellen, während die E1B-Genprodukte für die Progression und Aufrechterhaltung des vollständig transformierten Phänotyps notwendig sind (zur Übersicht: Williams *et al.*, 1995). In Adenovirus-transformierten Zellen liegt die virale DNA vollständig oder unvollständig im Wirtsgenom integriert vor, wobei alle onkogen transformierten Zellen konsistent das linke Ende des viralen Genoms mit den E1A/E1B-Regionen enthalten. Ebenso können in den meisten transformierten Zelllinien, die nach Transfektion rekombinanter Plasmide etabliert wurden, die E1A- und E1B-Onkogene in integrierter Form nachgewiesen werden. Entsprechend ist es etablierte wissenschaftliche Meinung, dass in Adenovirus- und plasmidtransformierten Zellen die E1A und E1B-Gene persistieren müssen (zur Übersicht: Graham, 1984).

Obwohl die Expression der E1A- und E1B-Gene zur onkogenen Transformation primärer Zellen in Kultur ausreicht, wurde schon lange vermutet, dass auch die Genprodukte der E4-Region am Prozess der virusvermittelten Onkogenese beteiligt sind (Bernards *et al.*, 1984; Graham, 1984; Zalmanzon, 1987; Javier *et al.*, 1992). Die ersten Hinweise für eine Beteiligung der E4-Region am Transformationsvorgang stammen aus frühen Analysen viraler Transkripte in virustransformierten Zellen (Flint *et al.*, 1975; Flint *et al.*, 1976; Flint und Sharp, 1976; Esche *et al.*, 1979; Esche, 1982) sowie dem Nachweis E4-spezifischer Antikörper in Tumorseren aus Hamstern (Brackmann *et al.*, 1980; Sarnow *et al.*, 1982a; Downey *et al.*, 1983). Weitere funktionelle Analysen ergaben, dass die Koexpression der E4-Region oder einzelner

Genprodukte mit E1A/E1B (E1) in etablierten Rattenzelllinien, die Ausbildung charakteristischer Merkmale onkogen transformierter Zellen verstärkt (Shiroki *et al.*, 1984; Öhman *et al.*, 1995). Für Adenovirus Serotyp 12 (Ad12) E1/E4-transformierte Zellen wurde beispielsweise eine gesteigerte Tumorigenität in Nacktmäusen nachgewiesen (Shiroki *et al.*, 1984). Mittlerweile konnten die transformierenden Eigenschaften der E4-Region auf mindestens zwei Genprodukte eingegrenzt werden: E4orf3 und E4orf6. Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, dass E4orf3 und E4orf6 von Adenovirus Serotyp 5 (Ad5) die E1B-Funktionen bezüglich der Transformationsinitiation in Kombination mit E1A ersetzen können und in Verbindung mit E1A plus E1B zur Ausbildung eines vollständig transformierten zellulären Phänotyps beitragen. Diese Beobachtungen unterstützen die Vorstellung, dass das onkogene Potenzial humaner Adenoviren nicht ausschließlich durch die E1A- und E1B-Onkogene determiniert wird.

6.1.1 E1A/E4-vermittelte „Hit & Run“-Transformation

Trotz funktioneller Überlappungen von E4orf3 und E4orf6 mit den Proteinen der E1B-Region unterscheidet sich der Ad5 E1A/E4-vermittelte Transformationsprozess grundlegend vom klassischen E1A/E1B-Weg. Während bei letzterem die viralen Gene in den transformierten Zellen persistieren, können in E1A/E4-transformierten Zellklonen keine E4- und nur in Ausnahmefällen E1A-spezifische DNAs nachgewiesen werden (5.1.2; Nevels *et al.*, 2001). Trotzdem sind einige dieser Zelllinien in der Lage, ein Tumorstadium in Nacktmäusen zu induzieren (Nevels *et al.*, 2001). Somit ist die transiente Expression von E1A mit E4orf3 oder E4orf6 für die onkogene Transformation primärer Zellen ausreichend. Analog dazu belegen andere Studien, dass die ständige Anwesenheit und Expression viraler Sequenzen nicht unbedingt für die Aufrechterhaltung des onkogenen Phänotyps Adenovirus-transformierter Zellen erforderlich ist (Paraskeva und Gallimore, 1980; Kuhlmann *et al.*, 1982; Paraskeva *et al.*, 1982; Pfeffer *et al.*, 1999). Diese Befunde entsprechen eindeutig dem „Hit & Run“-Szenario virusvermittelter Onkogenese.

Schon in den späten siebziger und frühen achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde den klassischen Prinzipien virusvermittelter Transformation, die auf der kontinuierlichen Expression viraler Onkoproteine beruhen, ein hypothetischer „Hit

& Run“-Mechanismus gegenübergestellt, bei dem virale Onkogene für die Initiation, nicht aber für die Aufrechterhaltung des transformierten Zustands notwendig sind (Skinner, 1976; Schlehofer und zur Hausen, 1982; Galloway und McDougall, 1983). Grundlage für diese Hypothese waren frühe Beobachtungen, dass Infektionen mit Herpes-Simplex-Virus (HSV), Ad12 und dem murinen Abelson-Leukämie-Virus (ALV) chromosomale Aberrationen und andere Mutationen im Wirtsgenom verursachen (zur Hausen, 1967; Waubke *et al.*, 1968; Schlehofer und zur Hausen, 1982; Mushinski *et al.*, 1983) und die Tatsache, dass in HSV-1-, Ad12- und ALV-transformierten Zellen nie konsistent virale DNA-Sequenzen nachgewiesen werden konnten (Skinner, 1976; Galloway und McDougall, 1983; Mushinski *et al.*, 1983 und zur Übersicht: Dörfler, 1996; zur Hausen, 1996b). Ähnliche Beobachtungen existieren auch für transformierte Hamsterzellen aus Ad12-induzierten Tumoren (Kuhlmann *et al.*, 1982; Pfeffer *et al.*, 1999) und Zellklonen, die mit Ad12 in Gewebekultur transformiert wurden (Paraskeva und Gallimore, 1980; Paraskeva *et al.*, 1982). Es wurde deshalb postuliert, dass die vorübergehende Expression und/oder Integration bestimmter viraler Gene ausreicht, um Mutationen zu induzieren („Hit“), die zur zellulären Transformation führen. Die Manifestierung des transformierten Phänotyps auf genetischer Ebene ist dann mit dem Verlust der viralen Erbinformation kompatibel („Run“).

Über die molekularen Grundlagen der E1A/E4-vermittelten „Hit & Run“-Transformation kann derzeit nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung liefert die Tatsache, dass beide E4-Proteine mutagene Eigenschaften besitzen (Nevels *et al.*, 2001). Die Anhäufung von Mutationen wird wahrscheinlich durch das Zusammenwirken mehrerer Faktoren ausgelöst, die sowohl die unfahrplanmäßige Induktion der zellulären DNA-Synthese durch E1A, als auch die Modulation zellulärer Regulatoren der Genexpression, Apoptose und DNA-Reparatur durch E4orf3 und E4orf6 umfassen. Beide E4-Proteine binden an die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), einem Schlüsselenzym in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Boyer *et al.*, 1999). Für die Wechselwirkung mit DNA-PK wird diskutiert, dass die Komplexbildung die Entstehung konkatemerer viraler Genome in lytisch infizierten Zellen verhindert (Weiden und Ginsberg, 1994; Boyer *et al.*, 1999; Nicolás *et al.*, 2000). Die Modulation

von DNA-PK und die damit verbundene Inhibition der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Boyer *et al.*, 1999; Nicolás *et al.*, 2000) könnte zur genetischen Instabilität beitragen. Eine andere Möglichkeit ergibt sich aus der Beobachtung, dass E4orf6 die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung (Dobner *et al.*, 1996; Querido *et al.*, 1997; Cathomen und Weitzman, 2000; Querido *et al.*, 2001) und Transrepression (Nevels *et al.*, 1997) über direkte Komplexbildung inhibiert. Das E4-Protein könnte dadurch DNA-Reparaturprozesse blockieren, die durch p53 transkriptionell aktiviert und/oder reprimiert werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Bindung von E4orf6 an die carboxyterminale Domäne des Tumorsuppressorproteins die Wechselwirkung mit Helikasen des *nucleotide excision repair* (XPB und XPD) verhindert (zur Übersicht: Ko und Prives, 1996). Ein weiterer Aspekt ergibt sich aus der Tatsache, dass alle viralen Proteine, die bisher mit „Hit & Run“-Transformation in Verbindung gebracht wurden, (SV40 TAg, HCMV IE1 und IE2) mit PODs assoziiert sind (Carvalho *et al.*, 1995; Ewald *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1997). Da auch E4orf3 mit PODs assoziiert und die Integrität der POD-Struktur verändert (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996 und diese Arbeit), besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen diesen multifunktionellen Domänen und der E4orf3-induzierten Mutagenese und Transformation (siehe 6.1.2).

6.1.2 E1A/E1B/E4orf3-vermittelte Hypertransformation

Während E4orf3 in Kombination mit E1A zur „Hit & Run“-Transformation beiträgt, wird das E4-Gen in Verbindung mit E1A und E1B in transformierten Zellen stabil exprimiert (5.1.1; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Nevels *et al.*, 1999a, b). In Übereinstimmung dazu belegen frühere Studien, dass in Adenovirus-transformierten Zellen gelegentlich E4-spezifische mRNAs existieren, die aber immer in Verbindung mit E1A und E1B und nie mit E1A alleine detektiert wurden (Flint *et al.*, 1975; Flint *et al.*, 1976; Flint und Sharp, 1976; Esche *et al.*, 1979; Esche, 1982; Esche und Siegman, 1982). Interessanterweise zeigen die aus den Transformationsversuchen mit E1A/E1B und E4orf3 etablierten Zelllinien gegenüber E1A/E1B- und „Hit & Run“-transformierten Zellklonen deutliche Unterschiede in Bezug auf verschiedene In-vitro-Merkmale onkogen transformierter Zellen (Nevels *et al.*, 1999b). Außerdem weisen diese Zellen eine erhöhte Tumorigenität und ein

dramatisch gesteigertes Tumorwachstum in NMRI(*nu/nu*)-Nacktmäusen auf (Nevels *et al.*, 1999a, b). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die E1B-Genprodukte mutagene Aktivitäten von E4orf3 neutralisieren, die zur „*Hit & Run*“-Transformation beitragen. Außerdem machen sie deutlich, dass E4orf3 zusammen mit den E1A- und E1B-Genprodukten, die vollständige, maligne Transformation primärer Zellen induziert. Die molekularen Grundlagen des onkogenen Potenzials von E4orf3 sind derzeit noch unklar. Im Unterschied zu E4orf6 scheint E4orf3 keinen Einfluss auf die Stabilität von p53 auszuüben (Nevels *et al.*, 1999b). Obwohl E4orf3 auch in transformierten ABT-Zellen mit PML in diskreten, morphologisch veränderten Strukturen kolokalisiert, konnte bislang keine physikalische Wechselwirkung mit dem Tumorsuppressorprotein nachgewiesen werden (König *et al.*, 1999; Nevels *et al.*, 1999b). Darüber hinaus interferiert das Adenovirus-Protein nicht mit der PML-induzierten Suppression der E1-vermittelten *Focus*-Bildung (Nevels *et al.*, 1999b). Trotzdem liegt der Verdacht nahe, dass die transformierenden Eigenschaften von E4orf3 zumindest teilweise auf die Interaktion mit POD-Komponenten zurückzuführen sind.

6.2 p300 ein zellulärer Interaktionspartner von Ad5 E4orf3

Auf der Suche nach zellulären Interaktionspartnern, die im Zusammenhang mit den transformierenden Aktivitäten von Ad5 E4orf3 stehen könnten, gelang im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Identifizierung des POD-assoziierten Proteins p300 (5.3.3). Zusammen mit CBP (*CREB binding protein*) gehört p300 zu einer Familie zellulärer Transkriptionskoaktivatoren, die mit einer Vielzahl zellulärer Transkriptionsfaktoren (z.B. p53 und c-jun), nukleären Rezeptoren und Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren (zur Übersicht: Goodman und Smolik, 2000). Sie besitzen Histonazetyltransferaseaktivität und modulieren die Vorgänge der Transkription vermutlich über Veränderungen der Chromatinstruktur. Ihre zentrale Rolle in der Steuerung der zellulären Proliferationskontrolle wird unter anderem durch die Tatsache illustriert, dass beide Proteine tumorsupprimierende Eigenschaften besitzen und prominente Ziele von viralen Onkoproteinen (z.B. SV40 TAg, Ad E1A, EBV EBNA2, HTLV-1 Tax, HHV8 vIRF und Polyomavirus LT) sind.

Die E1A 12S- und E1A 13S-Proteine inhibieren die Koaktivatorfunktionen beider Proteine vermutlich über die direkte Bindung ihrer aminoterminalen N/CR1-Region an die CH3-Domäne von CBP/p300 (5.3.4; 5.3.5), da Mutationen in diesen Bereichen zum Verlust der transformierenden Eigenschaften von E1A in Kombination mit E1B und anderen kooperierenden Onkoproteinen wie z.B. Ras führen (Egan *et al.*, 1988; Egan *et al.*, 1989; Jelsma *et al.*, 1989; Whyte *et al.*, 1989; Howe *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993).

6.2.1 Modulation der Funktion und subzellulären Lokalisation von p300

Immunpräzipitations- und In-vitro-Bindungsversuche zeigen, dass mit Ausnahme von Ad12, die E4orf3-Proteine der Serotypen 5, 9 und 40 vermutlich über ihre carboxyterminale Region an p300 binden (5.3.3.1; 5.3.4; 5.4.3). Die für die Wechselwirkung verantwortlichen Bereiche seitens p300 kartieren im aminoterminalen Bereich, der CH3-Domäne sowie einem angrenzenden glycinhaltigen Segment (5.3.4.3; 5.3.7.2) und überlappen damit teilweise mit den Binderegionen der E1A-Proteine. Neben diesen strukturellen Übereinstimmungen weisen die E4orf3-Polypeptide aller überprüften Serotypen auch funktionelle Überlappungen zu E1A auf. Ebenso wie E1A sind die Orf3-Proteine von Ad5, 9, 12 und 40 in der Lage die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p300 zu reprimieren (5.3.7.3). Dabei ist noch unklar, ob die E4orf3-vermittelte Transrepression über direkte Bindung an p300 und/oder durch eine Umverteilung des Tumorsuppressorproteins in *nuclear tracks* (Ad5, 9 und 12) bzw. *nuclear dots* (Ad40) erfolgt (5.3.3.2; 5.3.7.1). Ein Vergleich der Ergebnisse aus den In-vitro-Bindungs- und Promotor/Reporteranalysen (5.3.7) mit den E4orf3-Proteinen der Serotypen 5, 9, 40 (Tab. 7) und der Ad5 Mutante L103A (5.4.3; Tab. 8) zeigt, dass die alleinige Bindung an das B-Fragment von p300 für die Relokalisation und Transrepression notwendig und ausreichend ist. Dagegen scheint bei Ad12 E4orf3 ein anderer Mechanismus wirksam zu sein, bei dem das Ad12-Protein die p300-stimulierte Transkription indirekt über die Umverteilung des Tumorsuppressorproteins in *nuclear tracks* inhibiert (5.3.7.1).

SEROTYP	IN-VITRO-BINDUNG AN P300-FRAGMENTE ¹	KOLOKALISATION ²	REPRESSION ³
Ad5 E1A	N, A, B, C, D	?	+++
Ad5 E4orf3	N, B, C, D	+++	++
Ad9 E4orf3	N, B, C, D	++	+++
Ad12 E4orf3	–	++	++
Ad40 E4orf3	a, B, c, d	+	++

Tab. 7 Modulation von p300 durch Ad5 E1A und E4orf3-Proteine unterschiedlicher Serotypen

- ¹ Großbuchstaben: starke Bindung; Kleinbuchstaben: schwache Bindung; – keine Bindung
² +++ vollständig; ++ überwiegend; + partiell; – keine; ? unklar
³ +++ sehr stark; ++ stark

E4ORF3	TRANSFORMATION ¹	IN-VITRO-BINDUNG AN P300-FRAGMENTE ²	KOLOKALISATION ³	REPRESSION ⁴
WT	+	N, B, C, D	+++	++
L13A	↓	a, B, D	++	++
GG97/98AA	↑	b	+	+
L103A	↑	b	–	–

Tab. 8 Modulation von p300 durch E4orf3-Mutanten

- ¹ + Wildtyp-Aktivität; ↓ Verminderung; ↑ Verstärkung
² Großbuchstaben: starke Bindung; Kleinbuchstaben: schwache Bindung; – keine Bindung
³ +++ vollständig; ++ überwiegend; + partiell; – keine; ? unklar
⁴ ++ stark; + vermindert; – keine

6.2.2 Mechanismen der Ad5 E5orf3-vermittelten Transformation

Die Fähigkeit des Ad5 E4orf3-Proteins die stabile Transformation primärer Rattenzellen einzuleiten basiert vermutlich auf verschiedenen Aktivitäten, die zumindest teilweise über die Modulation der subnukleären Lokalisation und Funktion von p300 vermittelt werden. Dafür spricht vor allem die Beobachtung, dass das Ad5-Protein eine p300-bindungsdefiziente, transformationsdefekte E1A-Mutante

(E1delN) in BRK-Transformationsexperimenten komplementiert (5.3.6). Die Ergebnisse der Mutationsanalysen weisen jedoch darauf hin, dass auch p300-unabhängige Mechanismen eine wichtige Rolle im E4orf3-induzierten Transformationsvorgang spielen. Insbesondere die Beobachtung, dass Mutationen im aminoterminalen Teil die *Focus*-Bildung in Kombination mit E1A/E1B signifikant verringern (5.4.2) lässt vermuten, dass neben p300 auch andere zelluläre Proteine am Transformationsvorgang beteiligt sind. Ob es sich dabei um POD-assoziierte Faktoren handelt, kann beim gegenwärtigen Stand der Forschung noch nicht beantwortet werden. Im Unterschied zu den Aminosäureaustauschen im aminoterminalen Bereich von Ad5 E4orf3 resultieren Veränderungen im carboxyterminalen Segment in einer deutlichen Erhöhung der *Focus*-Bildung im Vergleich zum Wildtyp-Protein (5.4.2). Dies ist ein Hinweis darauf, dass dieser Abschnitt des Ad5-Proteins wachstumshemmende oder zytotoxische Effekte induziert, die möglicherweise mit der E4orf3-induzierten POD-Reorganisation in Verbindung stehen. Für diese Annahme spricht ebenfalls die Beobachtung, dass die POD-negative Mutante L103A (5.4.1.2) den stärksten kooperativen Effekt in Kombination mit E1A und E1B zeigt (5.4.2).

Über die molekularen Ursachen der E4orf3-induzierten negativen Effekte kann derzeit nur spekuliert werden. Möglicherweise stehen sie aber im Zusammenhang mit unserer früheren Beobachtung, dass E4orf3 auch einen negativen Einfluss auf die E1A-vermittelte *Focus*-Initiation hat wenn größere Plasmidmengen ($> 1 \mu\text{g}$) im Transfektionsansatz verwendet werden und der Tatsache, dass dieser Effekt durch die Koexpression von E1B eliminiert wird (Nevels *et al.*, 1999b). Da die E1B-Genprodukte bekanntermaßen auch jene Aktivitäten von E4orf3 neutralisieren, die zur „*Hit & Run*“-Transformation beitragen (siehe 6.1.2), könnten die wachstumshemmenden Aktivitäten der carboxyterminalen Region ebenfalls mit dem mutagenen Potenzial des Ad5 E4orf3-Proteins in Verbindung stehen. Eine mögliche Erklärung für die neutralisierenden Eigenschaften der E1B-Proteine bieten neue Beobachtungen, die darauf hinweisen, dass E4orf3 die p53-induzierten Vorgänge der Zellzyklusarretierung und/oder Apoptose indirekt über die Reorganisation von PODs stimuliert. Mittlerweile ist bekannt, dass die transkriptionsaktiven Funktionen von p53 über die Wechselwirkung mit den POD-assoziierten Tumor-

suppressorproteinen PML und p300 in den PODs reguliert werden (Fogal *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2000; Gottifredi und Prives, 2001). Somit besteht die Möglichkeit, dass E1B-55 kDa die E4orf3-abhängige Aktivierung von p53 und die damit verbundene Reduktion der *Focus*-Bildung über die Bindung an das Tumorsuppressorprotein blockiert. Dafür sprechen auch die Beobachtungen, dass das große E1B-Protein mit E4orf3 und p53 in PODs lokalisiert (König *et al.*, 1999; Leppard und Everett, 1999; Endter *et al.*, 2001). Schließlich könnte E1B-55 kDa die negativen Funktionen auch über die direkte Bindung an E4orf3 neutralisieren (Leppard und Everett, 1999; Nevels *et al.*, 1999b).

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass das transformierende Potenzial von E4orf3 mindestens zwei Komponenten umfasst, die durch das Zusammenwirken amino- und carboxyterminaler Bereiche vermittelt werden. Die Tatsache, dass die carboxyterminale Region an der Umstrukturierung von PODs und an der Bindung von p300 beteiligt ist (Abb. 40), deutet darauf hin, dass es sich dabei um ein wichtiges Strukturelement des E4orf3-Proteins handeln könnte.

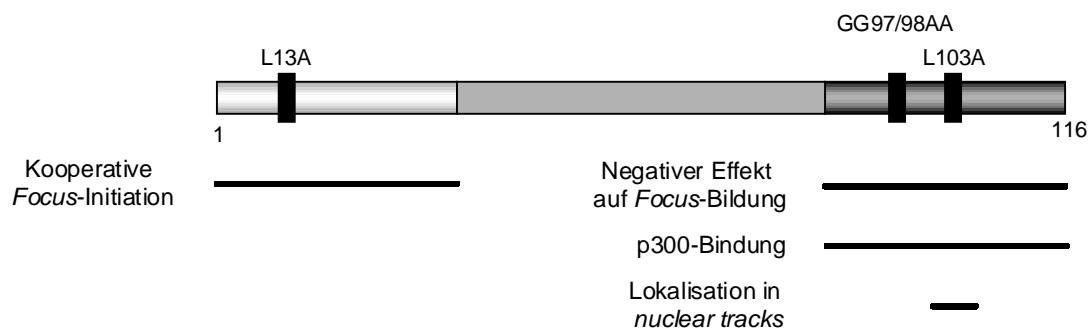


Abb. 40 Funktionelle Domänen des Ad5 E4orf3-Proteins

Mutationen im aminoterminalen Bereich (hellgrau; L13A) führen zum Verlust der transformierenden Eigenschaften des E4orf3-Proteins in Kombination mit E1, während Veränderungen in der carboxyterminalen Region (dunkelgrau; GG97/98AA und L103A) einen Anstieg der *Focus*-Bildung zur Folge haben. Die Punktmutante L103A lokalisiert nicht mehr in *nuclear tracks* und zeigt aber den stärksten kooperativen Effekt in BRK-Transformationsversuchen. Weiterhin vermittelt die carboxyterminale Region die Wechselwirkung mit p300. Die für die angegebenen Funktionen verantwortlichen Proteinabschnitte sind als durchgezogene Linien gekennzeichnet. Die Zahlen unterhalb der schematischen Darstellung von E4orf3 entsprechen den Aminosäurepositionen.

Darüber hinaus ist diese Region offensichtlich an der Kernlokalisierung (5.4.1.2) und der Wechselwirkung von Ad5 E4orf3 mit der Kernmatrix beteiligt. Mit großer

Wahrscheinlichkeit werden dafür neben p300 weitere Interaktionen mit anderen zellulären Komponenten benötigt. Die beschriebenen Mutationsanalysen liefern somit die Grundlage für weiterführende Untersuchungen, die das Verständnis über die Struktur/Funktionsbeziehungen der E4orf3-vermittelten Transformation weiter vertiefen werden. Die genaue Kenntnis der onkogenen Funktionen von E4orf3 sowie die weitere Aufklärung der molekularen Mechanismen seines mutagenen Potenzials sollte einerseits das Verständnis virusvermittelter Onkogenese erweitern und andererseits die biologische Sicherheit adenoviraler Vektoren gewährleisten.

6.3 Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse für Virologie und Medizin

Trotz ihrer transformierenden Eigenschaften in Nagetieren und in Gewebekultur konnten Adenoviren bislang nie überzeugend mit der Entstehung von malignen Erkrankungen des Menschen in Verbindung gebracht werden, da nur in wenigen Einzelfällen adenovirale DNA in Tumoren nachgewiesen werden konnte (Maitland *et al.*, 1981; Ibelgaufts *et al.*, 1982; Graham, 1984; Lawler *et al.*, 1994; Shenk, 1996; Kuwano *et al.*, 1997a, b). Die Fähigkeit der E1- und E4-Gene zur „Hit & Run“-Transformation impliziert jedoch, dass Adenoviren möglicherweise in die Tumorgenese eingreifen können, ohne dass die viralen Gene in den transformierten Zellen persistieren. Der Nachweis eines Kausalzusammenhangs zwischen Adenovirus-Infektion und Tumorentstehung wäre demnach nahezu unmöglich. Eine analoge Situation ergibt sich auch für andere humanpathogene Viren. So wurden in HSV-assoziierten Zervixkarzinomen und HSV-transformierten Zellen nie konsistent virale DNA-Sequenzen gefunden (zur Übersicht: Jones, 1995; zur Hausen, 1996b). Ähnliche Beobachtungen gibt es auch für andere Herpesviren (Gelb und Dohner, 1984; Karran *et al.*, 1990; Jox *et al.*, 1997; Legrand *et al.*, 1997; Ambinder, 2000) sowie humane Papillomaviren (Iwasaka *et al.*, 1992; zur Hausen, 1996a). Das „Hit & Run“-Prinzip virusvermittelter Onkogenese könnte folglich Allgemeingültigkeit besitzen und damit auch bestimmten virusabhängigen Transformationsvorgängen zugrunde liegen. Tatsächlich wurden die HCMV IE1/IE2-Genprodukte mit der „Hit & Run“-

Transformation assoziiert (Shen *et al.*, 1997). Da der „*Hit & Run*“-Mechanismus für keines der humanen Viren ausgeschlossen werden kann, besteht die Möglichkeit, dass viel mehr als die geschätzten 20% menschlicher Tumore auf Virusinfektionen zurückgehen. Das Dilemma der „*Hit & Run*“-Transformation ist jedoch offensichtlich. Falls diese Viren keine nachweisbaren und spezifischen Mutationen im Wirtsgenom hinterlassen, wird es auf der Basis des Nachweises viraler Nukleinsäuren letztlich nicht möglich sein, einen Zusammenhang zwischen Virusinfektion und Tumorentstehung herzustellen (Dobner, 2001).

Unabhängig von einer möglichen „*Hit & Run*“-Ätiologie menschlicher Tumorerkrankungen sei abschließend angemerkt, dass die letzten umfassenden Untersuchungen zur Assoziation von Adenoviren mit Tumorerkrankungen des Menschen über 20 Jahre zurückliegen und im wesentlichen auf die Detektion von DNA-Sequenzen und Antigenen der E1-Region von nur sechs humanen Serotypen beschränkt waren (Mackey *et al.*, 1979; Wold *et al.*, 1979). Vergleichbare Studien mit den heute zur Verfügung stehenden hochempfindlichen Methoden der PCR wären wünschenswert. Außerdem umfasst die Gruppe der humanen Adenoviren heute mittlerweile 50 verschiedene Serotypen. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass ähnlich zu der großen Familie der humanen Papillomaviren nur einige, bisher noch nicht molekularbiologisch charakterisierte Serotypen mit der Entstehung maligner Erkrankungen in Verbindung stehen (Dobner, 2001). Auch im Hinblick auf den zunehmenden Einsatz humaner Adenoviren in der Tumorthherapie (Alemany *et al.*, 2000) und als Vektorsystem in der somatischen Gentherapie (zur Übersicht: Benihoud *et al.*, 1999) stellt das onkogene und mutagene Potenzial beider E4-Proteine ein Sicherheitsrisiko dar. Aus diesem Grund wurde mittlerweile empfohlen die E4-Region aus allen Adenovirus-Vektoren zu entfernen (Täuber und Dobner, 2001b).

6.4 Herstellung E1/E4-komplementierender Helfer-Zelllinien

In den letzten 10 Jahren konzentrierten sich die Forschungstätigkeiten an humanen Adenoviren überwiegend auf ihre Anwendung als Vektorsystem. Im Mittelpunkt stehen dabei replikationsdefekte Adenovirus-Vektoren, die Deletionen in der E1- oder E1/E4-Region enthalten (*first* bzw. *second generation vectors*). Darüber hinaus

werden seit einigen Jahren auch konditional replikationskompetente Virusmutanten erprobt. Diese Gruppe adenoviraler Vektoren umfasst bedingt vermehrungsfähige Viren, die ganz oder teilweise die E1A/E1B- und E4-Transkriptionseinheiten enthalten und aufgrund genetischer Veränderungen in den Kontrollregionen und/oder kodierenden Bereichen der E1A- und E1B-Gene scheinbar selektiv in bestimmten Tumorzelltypen replizieren (zur Übersicht: Alemany *et al.*, 2000; Gómez-Navarro und Curiel, 2000). Der derzeit prominenteste Vertreter dieser Vektorgruppe ist die E1B-55kDa-defekte Virusmutante *dl1520 alias* ONYX-015 (Barker und Berk, 1987; Bischoff *et al.*, 1996). Trotz eines großen Anwendungspotenzials in der Gen- und Tumorthherapie wird der breite Einsatz dieser Vektoren noch immer durch zahlreiche Probleme limitiert (Alemany *et al.*, 2000). An erster Stelle stehen dabei die transformierenden und mutagenen Eigenschaften der E4-Proteine sowie die Beschränkung der lytischen Infektion auf maligne Zellen. Außerdem stehen bislang noch keine permissiven Helfer-Zelllinien zur Verfügung die eine effiziente Vermehrung sicherer E1/E4-Mutanten zu hochtitrigen Virusstocks erlauben.

Im Rahmen eines *Screening*-Programms zur Herstellung permissiver E1/E4-komplementierender Helfer-Zelllinien wurden in unserer Arbeitsgruppe Hinweise erhalten, dass primäre Kaninchenzellen für Adenovirus Serotyp 5 permissiv sind und möglicherweise durch adenovirale Onkogene transformiert werden können. Aus diesem Grund wurde im Verlauf dieser Arbeiten versucht stabil E1- und E1/E4-transformierte RLEC herzustellen. Durch klassische Transformationsexperimente gelang dabei erstmals der Nachweis, dass die adenoviralen Onkogene E1A und E1B tatsächlich die stabile Transformation primärer RLEC initiieren können. Auch durch Kombination von E4orf3 oder E4orf6 mit E1A plus E1B wurden *Foci* erhalten, die ebenfalls in permanente Zelllinien etabliert werden konnten. Analog zu transformierten BRK-Zellen weisen die RLE-Zellklone typische Merkmale vollständig onkogen transformierter Zellen auf. Diese umfassen morphologische Veränderungen (5.5.5), beschleunigtes Wachstum in Kultur (5.5.6) sowie erhöhte Tumorigenität und stark beschleunigtes Tumorstadium in Nacktmäusen (5.5.7). Infektionsexperimente zur Bestimmung der lytischen Replikation in E1/E4-exprimierenden RLE-Zellen zeigen, dass alle bislang getesteten Zellklone (5.5.2; 5.5.3) die Vermehrung verschiedener E1/E4- oder E4-defekter Adenovirus-Mutanten

ermöglichen. Somit stehen erstmals Helfer-Zelllinien zur Verfügung, die eine Anzucht replikationsdefekter *second generation* und konditional replikationskompetenter Adenovirus-Vektoren im präparativen Maßstab gewährleisten.

Im Unterschied zu nicht permissiven Nagerzellen ist es trotz zahlreicher Untersuchungen bisher nicht gelungen, primäre Zellen des Menschen mit infektiösen Adenoviren zu transformieren (Shenk, 1996). Entsprechend ist es etablierte Lehrbuchmeinung, dass der abortive Infektionsverlauf in nicht permissiven Wirtszellen den determinierenden Faktor der Adenovirus-vermittelten Onkogenese darstellt. Allerdings ist auch die plasmidinduzierte Transformation primärer Humanzellen im Vergleich zu Nagerzellen extrem ineffizient (Graham *et al.*, 1977; Byrd *et al.*, 1982; Whittaker *et al.*, 1984; Gallimore *et al.*, 1986; van den Heuvel *et al.*, 1992; Fallaux *et al.*, 1996; Fallaux *et al.*, 1998; Schiedner *et al.*, 2000). Folglich ist die Permissivität nicht der alleinig entscheidende Faktor im Transformationsvorgang. Diese Annahme wird durch die erhaltenen Ergebnisse zur Transformation permissiver RLE-Zellen unterstützt. Offensichtlich werden die Unterschiede in der Transformationseffizienz zwischen permissiven und nicht permissiven Zellen durch andere noch unbekannte Faktoren bestimmt. Ein möglicher Faktor könnte die unterschiedliche Verteilung viraler und zellulärer Proteine sein. Trotz großer phänotypischer Übereinstimmungen existieren zwischen transformierten BRK- und RLE-Zellen deutliche Unterschiede hinsichtlich der subzellulären Lokalisation der viralen Genprodukte (E1B-55 kDa und E4orf3) und des Tumorsuppressorproteins p53. So lokalisiert p53 in RLE-ABS1-5- und RLE-ABT2-4-Zellen nicht nur in *perinuclear bodies* sondern auch in nukleären punktförmigen Strukturen, die vermutlich den PODs entsprechen (5.5.3.2). Ein weiterer Unterschied zeigt sich in der Verteilung von Ad5 E4orf3. Analog zu virusinfizierten Humanzellen lokalisiert das Orf3-Protein in RLE-Zellen ausschließlich in *nuclear tracks* (5.5.3.2; 5.5.4), während es in stabil E1A/E1B/E4orf3-transformierten Rattenzellen in punktförmigen Kompartimenten vorliegt (5.3.1). Obwohl die Konsequenzen dieser Beobachtungen für die unterschiedliche Transformationseffizienz in permissiven und nicht permissiven Zellen noch völlig unklar sind, sollte es langfristig auf der Basis primärer RLE-Zellen möglich sein, einen detaillierten Einblick in die molekularen

Grundlagen der Adenovirus-vermittelten Transformation in Human- und Nagerzellen zu erhalten.

7 Literaturverzeichnis

- Ahn, J. H. und Hayward, G. S. (1997). The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol* **71**(6), 4599-4613.
- Ahn, J. H., Brignole, E. J. und Hayward, G. S. (1998). Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol Cell Biol* **18**(8), 4899-4913.
- Alcalay, M., Tomassoni, L., Colombo, E., Stoldt, S., Grignani, F., Fagioli, M., Szekely, L., Helin, K. und Pelicci, P. G. (1998). The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* **18**(2), 1084-1093.
- Alemaný, R., Balague, C. und Curiel, D. T. (2000). Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* **18**(7), 723-727.
- Ambinder, R. F. (2000). Gammaherpesviruses and "hit-and-run" oncogenesis. *Americ. J. Pathol.* **156**, 1-3.
- Ankerst, J., Jonsson, N., Kjellen, L., Norrby, E. und Sjogren, H. O. (1974a). Induction of mammary fibroadenomas in rats by adenovirus type 9. *Int. J. Cancer* **13**(3), 286-290.
- Ankerst, J., Steele, G., Jr. und Sjogren, H. O. (1974b). Cross-reacting tumor-associated antigen(s) of adenovirus type 9-induced fibroadenomas and a chemically induced mammary carcinoma in rats. *Cancer Res* **34**(8), 1794-1800.
- Ankerst, J. und Jonsson, N. (1989). Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. *J Natl Cancer Inst* **81**(4), 294-298.
- Arany, Z., Newsome, D., Oldread, E., Livingston, D. M. und Eckner, R. (1995). A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature* **374**(6517), 81-84.
- Armentano, D., Zabner, J., Sacks, C., Sookdeo, C. C., Smith, M. P., St. George, J. A., Wadsworth, S. C., Smith, A. E. und Gregory, R. J. (1997). Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors. *J. Virol.* **71**(3), 2408-2416.
- Asano, K., Merrick, W. C. und Hershey, J. W. (1997). The translation initiation factor eIF3-p48 subunit is encoded by int-6, a site of frequent integration by the mouse mammary tumor virus genome. *J Biol Chem* **272**(38), 23477-23480.

- Ascoli, C. A. und Maul, G. G.** (1991). Identification of a novel nuclear domain. *J Cell Biol* **112**(5), 785-795.
- Bagchi, S., Raychaudhuri, P. und Nevins, J. R.** (1990). Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* **62**(4), 659-669.
- Barker, D. D. und Berk, A. J.** (1987). Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology* **156**(1), 107-121.
- Beck, K. F., Stathopoulos, I., Berninger, M. G. und Schweizer, M.** (1993). Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *Biotechniques* **14**(3), 375.
- Bell, P., Lieberman, P. M. und Maul, G. G.** (2000). Lytic but not latent replication of epstein-barr virus is associated with PML and induces sequential release of nuclear domain 10 proteins. *J Virol* **74**(24), 11800-11810.
- Benihoud, K., Yeh, P. und Perricaudet, M.** (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotech.* **10**, 440-447.
- Benko, M. und Harrach, B.** (1998). A proposal for a new (third) genus within the family Adenoviridae. *Arch Virol* **143**(4), 829-837.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L. und Finberg, R. W.** (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323.
- Berk, A. J.** (1986). Functions of adenovirus E1A. *Cancer Surv* **5**(2), 367-387.
- Bernards, R., Vaessen, M. J., van der Eb, A. J. und Sussenbach, J. S.** (1983). Construction and characterization of an adenovirus type 5/adenovirus type 12 recombinant virus. *Virology* **131**(1), 30-38.
- Bernards, R. und van der Eb, A. J.** (1984). Adenovirus: Transformation and Oncogenicity. *Biochim. Biophys. Acta* **783**, 187-204.
- Bernards, R., de Leeuw, M. G., Vaessen, M. J., Houweling, A. und van der Eb, A. J.** (1984). Oncogenicity by adenovirus is not determined by the transforming region only. *J. Virol.* **50**(3), 847-853.

- Bernstein, R. M., Neuberger, J. M., Bunn, C. C., Callender, M. E., Hughes, G. R. und Williams, R.** (1984). Diversity of autoantibodies in primary biliary cirrhosis and chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* **55**(3), 553-560.
- Bischoff, J. R., Kirn, D. H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J. A., Sampson Johannes, A., Fattaey, A. und McCormick, F.** (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* **274**(5286), 373-376.
- Bloch, D. B., de la Monte, S. M., Guigaouri, P., Filippov, A. und Bloch, K. D.** (1996). Identification and characterization of a leukocyte-specific component of the nuclear body. *J Biol Chem* **271**(46), 29198-29204.
- Boddy, M. N., Howe, K., Etkin, L. D., Solomon, E. und Freemont, P. S.** (1996). PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* **13**(5), 971-982.
- Borden, K. L., Campbelldwyer, E. J., Carlile, G. W., Djavani, M. und Salvato, M. S.** (1998). Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J Virol* **72**(5), 3819-3826.
- Bouteille, M., Laval, M. und Dupuy-Coin, A. M.** (1974). "The Cell Nucleus." (H. Busch, Ed.) Academic Press, New York.
- Boyer, J., Rohleder, K. und Ketner, G.** (1999). Adenovirus E4 34k and E4 11k inhibit double strand break repair and are physically associated with the cellular DNA-dependent protein kinase. *Virology* **263**, 307-312.
- Boyer, J. L. und Ketner, G.** (2000). Genetic analysis of a potential zinc-binding domain of the adenovirus E4 34k protein. *J Biol Chem* **275**(20), 14969-14978.
- Boyle, J. S. und Lew, A. M.** (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet* **11**(1), 8.
- Brackmann, K. H., Green, M., Wold, W. S., Cartas, M., Matsuo, T. und Hashimoto, S.** (1980). Identification and peptide mapping of human adenovirus type 2-induced early polypeptides isolated by two-dimensional gel electrophoresis and immunoprecipitation. *J. Biol. Chem.* **255**(14), 6772-6779.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

- Bradley, W. E. und Letovanec, D.** (1982). High-frequency nonrandom mutational event at the adenine phosphoribosyltransferase (aprt) locus of sib-selected CHO variants heterozygous for aprt. *Somatic Cell Genet* **8**(1), 51-66.
- Bridge, E. und Ketner, G.** (1989). Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *J. Virol.* **63**(2), 631-638.
- Bridge, E. und Ketner, G.** (1990). Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. *Virology* **174**(2), 345-353.
- Brough, D. E., Lizonova, A., Hsu, C., Kulesa, V. A. und Kovesdi, I.** (1996). A gene transfer vector-cell line system for complete functional complementation of adenovirus early regions E1 and E4. *J Virol* **70**(9), 6497-6501.
- Brough, D. E., Hsu, H., Kulesa, V. A., Lee, G. M., Cantolupo, L. J., Lizonova, A. und Kovesdi, I.** (1997). Activation of transgene expression by early region 4 is responsible for a high level of persistent transgene expression from adenovirus vectors in vivo. *J. Virol.* **71**, 9206-9213.
- Brusca, J. S., Jannun, R. und Chinnadurai, G.** (1984). Efficient transformation of rat 3Y1 cells by human adenovirus type 9. *Virology* **136**(2), 328-337.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with b-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-379.
- Burgert, H. G. und Blusch, J. H.** (2000). Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes* **21**(1-2), 13-25.
- Byrd, P., Brown, K. W. und Gallimore, P. H.** (1982). Malignant transformation of human embryo retinoblasts by cloned adenovirus 12 DNA. *Nature* **298**(5869), 669-671.
- Carvalho, T., Seeler, J. S., Ohman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjärvi, G., Carmo Fonseca, M. und Dejean, A.** (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J. Cell. Biol.* **131**(1), 45-56.
- Cassani, F., Bianchi, F. B., Lenzi, M., Volta, U. und Pisi, E.** (1985). Immunomorphological characterisation of antinuclear antibodies in chronic liver disease. *J Clin Pathol* **38**(7), 801-805.
- Cathomen, T. und Weitzman, M. D.** (2000). A functional complex of adenovirus proteins E1B-55kDa and e4orf6 is necessary To modulate the expression level of p53 but not its transcriptional activity [In Process Citation]. *J Virol* **74**(23), 11407-11412.

- Chang, K. S., Stass, S. A., Chu, D. T., Deaven, L. L., Trujillo, J. M. und Freireich, E. J.** (1992). Characterization of a fusion cDNA (RARA/myl) transcribed from the t(15;17) translocation breakpoint in acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol* **12**(2), 800-810.
- Chauvin, C., Suh, M., Remy, C. und Benabid, A. L.** (1990). Failure to detect viral genomic sequences of three viruses (herpes simplex, simian virus 40 and adenovirus) in human and rat brain tumors. *Ital J Neurol Sci* **11**(4), 347-357.
- Chinnadurai, G.** (1998). Control of apoptosis by human adenovirus genes. *Semin. Virol.* **8**, 399-408.
- Christ, M., Louis, B., Stoeckel, F., Dieterle, A., Grave, L., Dreyer, D., Kintz, J., Ali Hadji, D., Lusky, M. und Mehtali, M.** (2000). Modulation of the inflammatory properties and hepatotoxicity of recombinant adenovirus vectors by the viral E4 gene products. *Hum Gene Ther* **11**(3), 415-427
- Cook, J. L. und Lewis, A. M., Jr.** (1987). Immunological surveillance against DNA-virus-transformed cells: correlations between natural killer cell cytolytic competence and tumor susceptibility of athymic rodents. *J Virol* **61**(7), 2155-2161.
- Cress, W. D. und Nevins, J. R.** (1996). Use of the E2F transcription factor by DNA tumor virus regulatory proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **208**, 63-78.
- Day, P. M., Roden, R. B., Lowy, D. R. und Schiller, J. T.** (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* **72**(1), 142-150.
- de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L. und Dejean, A.** (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**(4), 675-684.
- Dedieu, J. F., Vigne, E., Torrent, C., Jullien, C., Mahfouz, I., Caillaud, J. M., Aubailly, N., Orsini, C., Guillaume, J. M., Opolon, P., Delaere, P., Perricaudet, M. und Yeh, P.** (1997). Long-term gene delivery into the livers of immunocompetent mice with E1/E4-defective adenoviruses. *J. Virol.* **71**(6), 4626-4637.
- Desbois, C., Rousset, R., Bantignies, F. und Jalinot, P.** (1996). Exclusion of Int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I Tax oncoprotein. *Science* **273**(5277), 951-953.
- Devereux, J., Haeberli, P. und Smithies, O.** (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**(1 Pt 1), 387-395.
- Dix, B. R., Edwards, S. J. und Braithwaite, A. W.** (2001). Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway? *J Virol* **75**(12), 5443-5447.

- Dix, I. und Leppard, K. N.** (1993). Regulated splicing of adenovirus type 5 E4 transcripts and regulated cytoplasmic accumulation of E4 mRNA. *J. Virol.* **67**(6), 3226-3231.
- Dix, I. und Leppard, K.** (1995). Expression of adenovirus type 5 E4 Orf2 protein during lytic infection. *J. Gen. Virol.* **76**, 1051-1055.
- Dobbelstein, M., Roth, J., Kimberly, W. T., Levine, A. J. und Shenk, T.** (1997). Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO J.* **16**, 4276-4284.
- Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S. und Shenk, T.** (1996). Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* **272**, 1470-1473.
- Dobner, T.** (2001). Molekularbiologische Analysen zum transformierenden Potenzial humaner Adenoviren. Habilitationsschrift, Universität Regensburg, Regensburg.
- Dobner, T. und Kzhyshkowska, J.** (2001). Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr Top Microbiol Immunol* **259**, 25-54.
- Dörfler, W.** (1996). A new concept in adenoviral oncogenesis: integration of foreign DNA and its consequences. *Biochim. Biophys. Acta* **1288**, F79-F99.
- Dosch, T., Horn, F., Schneider, G., Kratzer, F., Dobner, T., Hauber, J. und Stauber, R. H.** (2001). The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein actively shuttles in virus-infected cells, whereas transport of E4orf6 is mediated by a CRM1-independent mechanism. *J Virol* **75**(12), 5677-5683.
- Doucas, V. und Evans, R. M.** (1996). The PML nuclear compartment and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1288**, M25-M29.
- Doucas, V., Ishov, A. M., Romo, A., Juguilon, H., Weitzman, M. D., Evans, R. M. und Maul, G. G.** (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev.* **10**, 196-207.
- Doucas, V. und Evans, R. M.** (1999). Human T-cell leukemia retrovirus-Tax protein is a repressor of nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6), 2633-2638.
- Downey, J. F., Rowe, D. T., Bacchetti, S., Graham, F. L. und Bayley, S. T.** (1983). Mapping of a 14,000-dalton antigen to early region 4 of the human adenovirus 5 genome. *J. Virol.* **45**(2), 514-523.
- Dulbecco, R. und Freeman, G.** (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**, 396-397.

- Dyck, J. A., Maul, G. G., Miller, W. H., Jr., Chen, J. D., Kakizuka, A. und Evans, R. M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* **76**(2), 333-343.
- Egan, C., Jelsma, T. N., Howe, J. A., Bayley, S. T., Ferguson, B. und Branton, P. E. (1988). Mapping of cellular protein-binding sites on the products of early-region 1A of human adenovirus type 5. *Mol Cell Biol* **8**(9), 3955-3959.
- Egan, C., Bayley, S. T. und Branton, P. E. (1989). Binding of the Rb1 protein to E1A products is required for adenovirus transformation. *Oncogene* **4**(3), 383-388.
- Enders, J. F., Bell, J. A. und Dingle, J. H. (1956). "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* **124**, 119-120.
- Endter, C., Kzhyshkowska, J., Stauber, R. und Dobner, T. (2001). SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20), 11312-11317.
- Esche, H., Schilling, R. und Doerfler, W. (1979) In vitro translation of adenovirus type 12-specific mRNA isolated from infected and transformed cells. *J Virol* **30**(1):21-31.
- Esche, H. (1982). Viral gene products in adenovirus type 2-transformed hamster cells. *J. Virol.* **41**, 1076-1082.
- Esche, H. und Siegmann, B. (1982) Expression of early viral gene products in adenovirus type 12-infected and -transformed cells. *J Gen Viro* **60**, 99-113.
- Everett, R. D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M. und Parkinson, J. (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *Embo J* **16**(7), 1519-1530.
- Everett, R. D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, A., Kathoria, M. und Parkinson, J. (1998). The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol* **72**(8), 6581-6591.
- Everett, R. D. (1999). A surprising role for the proteasome in the regulation herpesvirus infection. *TIBS* **24**, 293-295.
- Ewald, D., Li, M., Efrat, S., Auer, G., Wall, R. J., Furth, P. A. und Hennighausen, L. (1996). Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen. *Science* **273**(5280), 1384-1386.

- Fallaux, F. J., Kranenburg, O., Cramer, S. J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoebe, R. C. und Van Der Eb, A. J.** (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 7(2), 215-222.
- Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D. J., Hehir, K. M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S. J., van Ormondt, H., van der Eb, A. J., Valerio, D. und Hoebe, R. C.** (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9(13), 1909-1917.
- Flint, S. J., Gallimore, P. H. und Sharp, P. A.** (1975). Comparison of viral RNA sequences in adenovirus 2-transformed and lytically infected cells. *J. Mol. Biol.* 96, 47-68.
- Flint, S. J. und Sharp, P. A.** (1976). Adenovirus transcription. V. Quantitation of viral RNA sequences in adenovirus 2-infected and transformed cells. *J. Mol. Biol.* 106, 749-771.
- Flint, S. J., Sambrook, J., Williams, J. F. und Sharp, P. A.** (1976). Viral nucleic acid sequences in transformed cells. IV. A study of the sequences of adenovirus 5 DNA and RNA in four lines of adenovirus 5-transformed rodent cells using specific fragments of the viral genome. *Virology* 72(2), 456-470.
- Flint, J. und Shenk, T.** (1989). Adenovirus E1A protein paradigm viral transactivator. *Annu Rev Genet* 23, 141-161.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P. P., Will, H., Schneider, C. und Del Sal, G.** (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J.* 19(22), 6185-6195.
- Freyer, G. A., Katoh, Y. und Roberts, R. J.** (1984). Characterization of the major mRNAs from adenovirus 2 early region 4 by cDNA cloning and sequencing. *Nucleic Acids Res* 12(8), 3503-3519.
- Gabler, S., Schütt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T. und Dobner, T.** (1998). E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J Virol* 72(10), 7960-7971.
- Gallimore, P. H.** (1974). Interactions of adenovirus type 2 with rat embryo cells. Permissiveness, transformation and in vitro characteristics of adenovirus transformed rat embryo cells. *J Gen Virol* 25(2), 263-273.
- Gallimore, P. H., Byrd, P. J., Whittaker, J. L. und Grand, R. J.** (1985). Properties of rat cells transformed by DNA plasmids containing adenovirus type 12 E1 DNA or specific fragments of the E1 region: comparison of transforming frequencies. *Cancer Res* 45(6), 2670-2680.

- Gallimore, P. H., Grand, R. J. und Byrd, P. J.** (1986). Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *Anticancer Res* **6**(3 Pt B), 499-508.
- Galloway, D. A. und McDougall, J. K.** (1983). The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a 'hit-and-run' mechanism. *Nature* **302**(5903), 21-24.
- Gao, G. P., Yang, Y. und Wilson, J. M.** (1996). Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J. Virol.* **70**(12), 8934-8943.
- Gelb, L. und Dohner, D.** (1984). Varicella-zoster virus-induced transformation of mammalian cells in vitro. *J Invest Dermatol* **83**(1 Suppl), 77s-81s.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. und Parks, W. P.** (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**(5), 1417-1423.
- Goddard, A. D., Borrow, J. und Solomon, E.** (1992). A previously uncharacterized gene, PML, is fused to the retinoic acid receptor alpha gene in acute promyelocytic leukaemia. *Leukemia* **6**(Suppl 3), 117S-119S.
- Gómez-Navarro, J. G. und Curiel, D. T.** (2000). Conditionally replicative adenoviral vectors for cancer gene therapy. *The Lancet* **1**, 148-158.
- Goodman, R. H. und Smolik, S.** (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* **14**(13), 1553-1577.
- Goodrum, F., Shenk, T. und Ornelles, D. A.** (1996). Adenovirus early region 4 34-kilodalton protein directs the nuclear localization of the early region 1B 55-kilodalton protein in primate cells. *J. Virol.* **70**, 6323-6335.
- Goodrum, F. und Ornelles, D. A.** (1997). The early region 1B 55-kilodalton oncoprotein of adenovirus relieves growth restrictions imposed on viral replication by the cell cycle. *J. Virol.* **71**, 548-561.
- Gottifredi, V und Prives, C.** (2001) P53 and PML: new partners in tumor suppression. *Trends Cell Biol* **11**(5):184-187.
- Graham, F. L. und van der Eb, A. J.** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**(2), 456-467.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1), 59-74.

- Graham, F. L.** (1984). Transformation by and oncogenicity of human adenoviruses. In "The adenoviruses" (H. S. Ginsberg, Ed.), pp. 339-398. Plenum Press, New York.
- Grand, R. J., Grant, M. L. und Gallimore, P. H.** (1994). Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology* **203**(2), 229-240.
- Grave, L., Dreyer, D., Dieterle, A., Leroy, P., Michou, A. I., Doderer, C., Pavirani, A., Lusky, M. und Mehtali, M.** (2000). Differential influence of the E4 adenoviral genes on viral and cellular promoters. *J Gene Med* **2**(6), 433-443.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W. und Paolo Pandolfi, P.** (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis [In Process Citation]. *Nat. Cell. Biol.* **2**(10), 730-736.
- Halbert, D. N., Cutt, J. R. und Shenk, T.** (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J. Virol.* **56**(1), 250-257.
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4), 557-580.
- Harlow, E., Pim, D. C. und Crawford, L. V.** (1981). Complex of simian virus 40 large-T antigen and host 53,000-molecular-weight protein in monkey cells. *J Virol* **37**(2), 564-573.
- Harlow, E., Franza, B. R., Jr. und Schley, C.** (1985). Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products. *J Virol* **55**(3), 533-546.
- Harlow, E. und Lane, D. P.** (1988). "Antibodies, a laboratory manual." (E. Harlow, and D. P. Lane, Eds.), Cold Spring Harbor.
- Hatt, J., Callahan, M. und Greener, A.** (1992). *Strategies* **5**, 2-3.
- Herisse, J., Rigolet, M., de Dinechin, S. D. und Galibert, F.** (1981). Nucleotide sequence of adenovirus 2 DNA fragment encoding for the carboxylic region of the fiber protein and the entire E4 region. *Nucleic Acids Res* **9**(16), 4023-4042.
- Hilleman, M. R. und Werner, J. H.** (1954). Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **85**, 183-188.

- Hodges, M., Tissot, C., Howe, K., Grimwade, D. und Freemont, P. S.** (1998). Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am J Hum Genet* **63**(2), 297-304.
- Horwitz, M. S.** (1996). Adenoviruses. Third ed. In "Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe und P. M. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 2149-2171. Lippincott-Raven, New York.
- Horwitz, M. S.** (2001). Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology* **279**(1), 1-8.
- Houweling, A., van den Elsen, P. J. und van der Eb, A. J.** (1980). Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* **105**(2), 537-550.
- Howe, J. A., Mymryk, J. S., Egan, C., Branton, P. E. und Bayley, S. T.** (1990). Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(15), 5883-5887.
- Huang, M. M. und Hearing, P.** (1989). Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J. Virol.* **63**(6), 2605-2615.
- Huebner, R. J., Rowe, W. P., Ward, T. G., Parrot, R. H. und Bell, J. A.** (1954). Adenoidal-pharyngeal conjunctival agents. *N. Engl. J. Med.* **251**, 1077-1086.
- Hutton, F. G., Turnell, A. S., Gallimore, P. H. und Grand, R. J.** (2000). Consequences of disruption of the interaction between p53 and the larger adenovirus early region 1B protein in adenovirus E1 transformed human cells. *Oncogene* **19**(3), 452-462.
- Ibelgaufits, H., Jones, K. W., Maitland, N. und Shaw, J. F.** (1982). Adenovirus-related RNA sequences in human neurogenic tumours. *Acta Neuropathol. Berl.* **56**(2), 113-117.
- Inozemtseva, L. S., Manuilova, E. S., Marshak, M. I., Nikolaeva, N. P., Gnedei, S. N. und Grivennikov, I. A.** (1997). [Isolation and characterization of immortalized human fibroblasts]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* **3**, 27-33.
- Ishov, A. M. und Maul, G. G.** (1996). The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J. Cell. Biol.* **134**(4), 815-826.
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T., Strauss, J. F., 3rd und Maul, G. G.** (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* **147**(2), 221-234.

- Iwasaka, T., Hayashi, Y., Yokoyama, M., Hara, K., Matsuo, N. und Sugimori, H.** (1992). 'Hit and run' oncogenesis by human papillomavirus type 18 DNA. *Acta Obstet Gynecol Scand* **71**(3), 219-223.
- Javier, R., Raska, K., Jr., Macdonald, G. J. und Shenk, T.** (1991). Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J Virol* **65**(6), 3192-3202.
- Javier, R., Raska, K. J. und Shenk, T.** (1992). Requirement for the adenovirus type 9 E4 region in production of mammary tumors. *Science* **257**(5074), 1267-1271.
- Javier, R. T.** (1994). Adenovirus type 9 E4 open reading frame 1 encodes a transforming protein required for the production of mammary tumors in rats. *J. Virol.* **68**(6), 3917-3924.
- Javier, R. T. und Shenk, T.** (1996). Mammary tumors induced by human adenovirus type 9: A role for the viral early region 4 gene. *Breast Cancer Research and Treatment* **39**, 57-67.
- Jelsma, T. N., Howe, J. A., Mymryk, J. S., Eveleigh, C. M., Cunniff, N. F. und Bayley, S. T.** (1989). Sequences in E1A proteins of human adenovirus 5 required for cell transformation, repression of a transcriptional enhancer, and induction of proliferating cell nuclear antigen. *Virology* **171**(1), 120-130.
- Jones, N.** (1995). Transcriptional modulation by the adenovirus E1A gene. *Curr Top Microbiol Immunol* **199**((Pt 3)), 59-80.
- Jonsson, N. und Ankerst, J.** (1977). Studies on adenovirus type 9-induced mammary fibroadenomas in rats and their malignant transformation. *Cancer* **39**(6), 2513-2519.
- Jox, A., Rohen, C., Belge, G., Bartnitzke, S., Pawlita, M., Diehl, V., Bullerdiek, J. und Wolf, J.** (1997). Integration of Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma cells leads to a region of enhanced chromosome instability. *Ann Oncol* **8**(Suppl 2), 131-135.
- Kaelin, W. G., Jr., Pallas, D. C., DeCaprio, J. A., Kaye, F. J. und Livingston, D. M.** (1991). Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* **64**(3), 521-532.
- Kakizuka, A., Miller, W. H., Jr., Umesono, K., Warrell, R. P., Jr., Frankel, S. R., Murty, V. V., Dmitrovsky, E. und Evans, R. M.** (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* **66**(4), 663-674.
- Karran, L., Teo, C. G., King, D., Hitt, M. M., Gao, Y. N., Wedderburn, N. und Griffin, B. E.** (1990). Establishment of immortalized primate epithelial cells with sub-genomic EBV DNA. *Int J Cancer* **45**(4), 763-772.

- Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette-Egly, C., Gaub, M. P., Durand, B., Lanotte, M., Berger, R. und Chambon, P.** (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *Embo J* **11**(2), 629-642.
- Kleinberger, T. und Shenk, T.** (1993). Adenovirus E4orf4 protein binds to protein phosphatase 2A, and the complex down regulates E1A-enhanced junB transcription. *J. Virol.* **67**(12), 7556-7560.
- Ko, L. J. und Prives, C.** (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* **10**, 1054-1072.
- Kochanek, S.** (1999a). Development of high-capacity adenoviral vectors for gene therapy. *Thromb Haemost* **82**(2), 547-551.
- Kochanek, S.** (1999b). High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* **10**(15), 2451-2459.
- Koken, M. H., Puvion-Dutilleul, F., Guillemain, M. C., Viron, A., Linares-Cruz, G., Stuurman, N., de Jong, L., Szostecki, C., Calvo, F., Chomienne, C. und et al.** (1994). The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *Embo J* **13**(5), 1073-1083.
- König, C., Roth, J. und Dobbelstein, M.** (1999). Adenovirus type 5 E4orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55-kilodalton protein. *J. Virol.* **73**(3), 2253-2262.
- Krätzer, F., Rosorius, O., Heger, P., Hirschmann, N., Dobner, T., Hauber, J. und Stauber, R. H.** (2000). The adenovirus type 5 E1B-55k oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2. *Oncogene* **19**, 850-857.
- Kuhlmann, I., Achten, S., Rudolph, R. und Doerfler, W.** (1982). Tumor induction by human adenovirus type 12 in hamsters: loss of the viral genome from adenovirus type 12-induced tumor cells is compatible with tumor formation. *EMBO J.* **1**(1), 79-86.
- Kuwano, K., Kawasaki, M., Kunitake, R., Hagimoto, N., Nomoto, Y., Matsuba, T., Nakanishi, Y. und Hara, N.** (1997a). Detection of group C adenovirus DNA in small-cell lung cancer with the nested polymerase chain reaction. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **123**, 377-382.
- Kuwano, K., Nomoto, Y., Kunitake, R., Hagimoto, N., Matsuba, T., Nakanishi, Y. und Hara, N.** (1997b). Detection of adenovirus E1A DNA in pulmonary fibrosis using nested polymerase chain reaction. *Eur. Respir. J.* **10**, 1445-1449.
- Kzhyshkowska, J., Schütt, H., Liss, M., Kremmer, E., Stauber, R., Wolf, H. und Dobner, T.** (2001). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is methylated in its Arg-Gly-Gly (RGG)

- box and interacts with human arginine methyltransferase HRMT1L1. *Biochem J* **358**(Pt 2), 305-314.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-685.
- Lai, H. K. und Borden, K. L.** (2000). The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. *Oncogene* **19**(13), 1623-1634.
- LaMorte, V. J., Dyck, J. A., Ochs, R. L. und Evans, R. M.** (1998). Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9), 4991-4996.
- Lavoie, J. N., Nguyen, M., Marcellus, R. C., Branton, P. E. und Shore, G. C.** (1998). E4orf4, a novel adenovirus death factor that induces p53-independent apoptosis by a pathway that is not inhibited by zVAD-fmk. *J. Cell. Biol.* **140**, 637-645.
- Lawler, M., Humphries, P., O'Farrelly, C., Hoey, H., Sheils, O., Jeffers, M., O'Briain, D. S. und Kelleher, D.** (1994). Adenovirus 12 E1A gene detection by polymerase chain reaction in both the normal and coeliac duodenum. *Gut* **35**(9), 1226-1232.
- Legrand, A., Mayer, E. P., Dalvi, S. S. und Nachtigal, M.** (1997). Transformation of rabbit vascular smooth muscle cells by human cytomegalovirus morphological transforming region I. *Am J Pathol* **151**(5), 1387-1395.
- Lehming, N., Le Saux, A., Schuller, J. und Ptashne, M.** (1998). Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13), 7322-7326.
- Leppard, K. N. und Everett, R. D.** (1999). The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *J. Gen. Virol.* **80**(Pt 4), 997-1008.
- Logan, J. und Shenk, T.** (1984). Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(12), 3655-3659.
- Lowe, S. W. und Ruley, H. E.** (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* **7**(4), 535-545.
- Lundblad, J. R., Kwok, R. P., Lurance, M. E., Harter, M. L. und Goodman, R. H.** (1995). Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature* **374**(6517), 85-88.

- Lusky, M., Christ, M., Rittner, K., Dieterle, A., Dreyer, D., Mourot, B., Schultz, H., Stoeckel, F., Pavirani, A. und Mehtali, M.** (1998). In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol* **72**(3), 2022-2032.
- Mackey, J. K., Rigden, P. M. und Green, M.** (1976). Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **73**(12), 4657-4661.
- Mackey, J. K., Green, M., Wold, W. S. M. und Ridgen, P.** (1979). Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 4. *J. Natl. Cancer Inst.* **62**, 23-26.
- Maitland, N. J., Kinross, J. H., Busuttil, A., Ludgate, S. M., Smart, G. E. und Jones, K. W.** (1981). The detection of DNA tumour virus-specific RNA sequences in abnormal human cervical biopsies by in situ hybridization. *J. Gen. Virol.* **55**(Pt 1), 123-137.
- Mannick, J. B., Cohen, J. I., Birkenbach, M., Marchini, A. und Kieff, E.** (1991). The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol* **65**(12), 6826-6837.
- Marcellus, R. C., Teodoro, J. G., Wu, T., Brough, D. E., Ketner, G., Shore, G. C. und Branton, P. E.** (1996). Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis. *J. Virol.* **70**, 6207-6215.
- Marcellus, R. C., Lavoie, J. N., Boivin, D., Shore, G. C., Ketner, G. und Branton, P. E.** (1998). The early region 4 orf4 protein of human adenovirus type 5 induces p53-independent cell death by apoptosis. *J. Virol.* **72**, 7144-7153.
- Marton, M. J., Baim, S. B., Ornelles, D. A. und Shenk, T.** (1990). The adenovirus E4 17-kilodalton protein complexes with the cellular transcription factor E2F, altering its DNA-binding properties and stimulating E1A-independent accumulation of E2 mRNA. *J Virol* **64**(5), 2345-2359.
- Maul, G. G. und Everett, R. D.** (1994). The nuclear location of PML, a cellular member of the C3HC4 zinc-binding domain protein family, is rearranged during herpes simplex virus infection by the C3HC4 viral protein ICP0. *J Gen Virol* **75**(Pt 6), 1223-1233.
- Maul, G. G.** (1998). Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *BioEssays* **20.8**, 660-667.
- McLorie, W., McGlade, C. J., Takayasu, D. und Branton, P. E.** (1991). Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. *J Gen Virol* **72**(Pt 6), 1467-1471.

- Mitsudomi, T., Steinberg, S. M., Nau, M. M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H. K., Linnoila, R. I., Mulshine, J. L., Minna, J. D. und et al.** (1992). p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* **7**(1), 171-180.
- Modrow, S. und Falke, D.** (1997). "Molekulare Virologie." Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Moore, M., Horikoshi, N. und Shenk, T.** (1996). Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11295-11301.
- Muller, S., Matunis, M. J. und Dejean, A.** (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* **17**(1), 61-70.
- Muller, S. und Dejean, A.** (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* **73**(6), 5137-5143.
- Müller, U., Kleinberger, T. und Shenk, T.** (1992). Adenovirus E4orf4 protein reduces phosphorylation of c-Fos and E1A proteins while simultaneously reducing the level of AP-1. *J. Virol.* **66**(10), 5867-5878.
- Mushinski, J. F., Potter, M., Bauer, S. R. und Reddy, E. P.** (1983). DNA rearrangement and altered RNA expression of the c-myc oncogene in mouse plasmacytoid lymphosarcomas. *Science* **220**(4599), 795-798.
- Nevels, M., Rubenwolf, S., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T.** (1997). The adenovirus E4orf6 protein can promote E1A/E1B-induced focus formation by interfering with p53 tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1206-1211.
- Nevels, M.** (1999). Dissertation, Universität Regensburg, Regensburg.
- Nevels, M., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T.** (1999a). The adenovirus E4orf6 protein contributes to malignant transformation by antagonizing E1A-induced accumulation of the tumor suppressor protein p53. *Oncogene* **18**, 9-17.
- Nevels, M., Täuber, B., Kremmer, E., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T.** (1999b). Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J. Virol.* **73**(2), 1591-1600.
- Nevels, M., Rubenwolf, S., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T.** (2000). Two distinct activities contribute to the oncogenic potential of the adenovirus type 5 E4orf6 protein. *J. Virol.* **74**, 5168-5181.

- Nevels, M., Täuber, B., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T. (2001). "Hit-and-run" transformation by adenovirus oncogenes. *J. Virol.* **75**, 3089-3094.
- Nicolás, A. L., Munz, P. L., Falck-Pedersen, E. und Young, C. S. H. (2000). Creation and repair of specific DNA double-strand breaks *in vivo* following infection with adenovirus vectors expressing *Saccharomyces cerevisiae* HO endonuclease. *Virology* **266**, 211-224.
- Öhman, K., Nordquist, K., Linder, S. und Äkusjärvi, G. (1995). Effect of adenovirus-2 early region 4 products on E1 transformation. *International Journal of Oncology* **6**, 663-668.
- O'Neal, W. K., Zhou, H., Morral, N., Aguilar Cordova, E., Pestaner, J., Langston, C., Mull, B., Wang, Y., Beaudet, A. L. und Lee, B. (1998). Toxicological comparison of E2a-deleted and first-generation adenoviral vectors expressing alpha1-antitrypsin after systemic delivery. *Hum Gene Ther* **9**(11), 1587-1598.
- Orlando, J. S. und Ornelles, D. A. (1999). An arginine-faced amphipathic alpha helix is required for adenovirus type 5 E4orf6 protein function. *J. Virol.* **73**(6), 4600-4610.
- Pandolfi, P. P., Grignani, F., Alcalay, M., Mencarelli, A., Biondi, A., LoCoco, F. und Pelicci, P. G. (1991). Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene* **6**(7), 1285-1292.
- Paraskeva, C. und Gallimore, P. H. (1980). Tumorigenicity and in vitro characteristics of rat liver epithelial cells and their adenovirus-transformed derivatives. *Int J Cancer* **25**(5), 631-639.
- Paraskeva, C., Brown, K. W., Dunn, A. R. und Gallimore, P. H. (1982). Adenovirus type 12-transformed rat embryo brain and rat liver epithelial cell lines: adenovirus type 12 genome content and viral protein expression. *J Virol* **44**(2), 759-764.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P. und Pelicci, P. G. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**(6792), 207-210.
- Pfeffer, A., Schubbert, R., Orend, G., Hilger Eversheim, K. und Doerfler, W. (1999). Integrated viral genomes can be lost from adenovirus type 12-induced hamster tumor cells in a clone-specific, multistep process with retention of the oncogenic phenotype. *Virus Res* **59**(1), 113-127.
- Powell, F., Schroeter, A. L. und Dickson, E. R. (1984). Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Lancet* **1**(8371), 288-289.

- Puvion-Dutilleul, F., Chelbi-Alix, M. K., Koken, M., Quignon, F., Puvion, E. und de The, H.** (1995). Adenovirus infection induces rearrangements in the intranuclear distribution of the nuclear body-associated PML protein. *Exp. Cell. Res.* **218**(1), 9-16.
- Querido, E., Marcellus, R., Lai, A., Rachel, C., Teodoro, J. G., Ketner, G. und Branton, P. E.** (1997). Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J. Virol.* **71**, 3788-3798.
- Querido, E., Morrison, M. R., Chu-Pham-Dang, H., Thirlwell, S. W., Boivin, D., Branton, P. E. und Morisson, M. R.** (2001). Identification of three functions of the adenovirus e4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. *J Virol* **75**(2), 699-709.
- Rafii, S., Dias, S., Meeus, S., Hattori, K., Ramachandran, R., Feuerback, F., Worgall, S., Hackett, N. R. und Crystal, R. G.** (2001). Infection of endothelium with E1(-)E4(+), but not E1(-)E4(-), adenovirus gene transfer vectors enhances leukocyte adhesion and migration by modulation of ICAM-1, VCAM-1, CD34, and chemokine expression. *Circ Res* **88**(9), 903-910.
- Raska, K., Jr. und Gallimore, P. H.** (1982). An inverse relation of the oncogenic potential of adenovirus-transformed cells and their sensitivity to killing by syngeneic natural killer cells. *Virology* **123**(1), 8-18.
- Regad, T., Saib, A., Lallemand-Breitenbach, V., Pandolfi, P. P., de The, H. und Chelbi-Alix, M. K.** (2001). PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *Embo J* **20**(13), 3495-3505.
- Romeis, B.** (1989). "Mikroskopische Technik." (P. Bock, Ed.) Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
- Ross, D. und Ziff, E.** (1992). Defective synthesis of early region 4 mRNAs during abortive adenovirus infections in monkey cells. *J Virol* **66**(5), 3110-3117.
- Roth, J., König, C., Wienzek, S., Weigel, S., Ristea, S. und Dobbelstein, M.** (1998). Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-Kilodalton and E4 34-Kilodalton oncoproteins. *J. Virol.* **72**, 8510-8516.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrot, R. H. und Ward, T. G.** (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing sponateous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **84**, 570-573.
- Rubenwolf, S., Schütt, H., Nevels, M., Wolf, H. und Dobner, T.** (1997). Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. *J. Virol.* **71**(2), 1115-1123.

- Ruggero, D., Wang, Z. G. und Pandolfi, P. P.** (2000). The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. *Bioessays* **22**(9), 827-835.
- Russell, W. C.** (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* **81 Pt 11**, 2573-2604.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839), 487-491.
- Saitoh, H. und Hinchey, J.** (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* **275**(9), 6252-6258.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual." (N. Ford, C. Nolan, and M. Ferguson, Eds.), 2 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sarnow, P., Hearing, P., Anderson, C. W., Reich, N. und Levine, A. J.** (1982a). Identification and characterization of an immunologically conserved adenovirus early region 11,000 Mr protein and its association with the nuclear matrix. *J. Mol. Biol.* **162**(3), 565-583.
- Sarnow, P., Ho, Y. S., Williams, J. und Levine, A. J.** (1982b). Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* **28**(2), 387-394.
- Sarnow, P., Hearing, P., Anderson, C. W., Halbert, D. N., Shenk, T. und Levine, A. J.** (1984). Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J. Virol.* **49**(3), 692-700.
- Schiedner, G., Hertel, S. und Kochanek, S.** (2000). Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production [In Process Citation]. *Hum. Gene Ther.* **11**(15), 2105-2116.
- Schlehofer, J. R. und zur Hausen, J. Z.** (1982). Induction of mutations within the host cell genome by partially inactivated herpes simplex virus type 1. *Virology* **122**(2), 471-475.
- Schütt, H.** (2000). Dissertation. Universität Regensburg, Regensburg.
- Seeler, J. S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C. und Dejean, A.** (1998). Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13), 7316-7321.

- Sharma, R. C. und Schimke, R. T.** (1996). Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* **20**(1), 42-44.
- Sharp, P. A., Gallimore, P. H. und Flint, S. J.** (1975). Mapping of adenovirus 2 RNA sequences in lytically infected cells and transformed cell lines. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **39 Pt 1**, 457-474.
- Shen, Y., Zhu, H. und Shenk, T.** (1997). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3341-3345.
- Shenk, T.** (1996). Adenoviridae: the viruses and their replication. Third ed. In "Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 2111-2148. Lippincott-Raven, New York.
- Shiroki, K., Hashimoto, S., Saito, I., Fukui, Y., Fukui, Y., Kato, H. und Shimojo, H.** (1984). Expression of the E4 gene is required for establishment of soft-agar colony-forming rat cell lines transformed by the adenovirus 12 E1 gene. *J. Virol.* **50**(3), 854-863.
- Shtrichman, R. und Kleinberger, T.** (1998). Adenovirus type 5 E4 open reading frame 4 protein induces apoptosis in transformed cells. *J. Virol.* **72**, 2975-2982.
- Sinclair, A. J., Palmero, I., Peters, G. und Farrell, P. J.** (1994). EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Embo J* **13**(14), 3321-3328.
- Skinner, G. R.** (1976). Transformation of primary hamster embryo fibroblasts by type 2 simplex virus: evidence for a "hit and run" mechanism. *Br. J. Exp. Pathol.* **57**(4), 361-376.
- Smith, D. B. und Johnson, K. S.** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**(1), 31-40.
- Steegenga, W. T., Riteco, N., Jochimsen, A. G., Fallaux, F. J. und Bos, J. L.** (1998). The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene* **16**, 349-357.
- Stein, R. W., Corrigan, M., Yaciuk, P., Whelan, J. und Moran, E.** (1990). Analysis of E1A-mediated growth regulation functions: binding of the 300-kilodalton cellular product correlates with E1A enhancer repression function and DNA synthesis-inducing activity. *J. Virol.* **64**(9), 4421-4427.
- Sternsdorf, T., Jensen, K. und Will, H.** (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J. Cell Biol.* **139**(7), 1621-1634.

- Stout, J. T. und Caskey, C. T.** (1985). HPRT: gene structure, expression, and mutation. *Annu Rev Genet* **19**, 127-148.
- Stuurman, N., de Graaf, A., Floore, A., Josso, A., Humbel, B., de Jong, L. und van Driel, R.** (1992). A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J Cell Sci* **101**(Pt 4), 773-784.
- Subramanian, T., Kuppuswamy, M., Nasr, R. J. und Chinnadurai, G.** (1988). An N-terminal region of adenovirus E1a essential for cell transformation and induction of an epithelial cell growth factor. *Oncogene* **2**(2), 105-112.
- Szekely, L., Pokrovskaja, K., Jiang, W. Q., de The, H., Ringertz, N. und Klein, G.** (1996). The Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5 accumulates in PML-containing bodies. *J Virol* **70**(4), 2562-2568.
- Täuber, B.** (1998). Diplomarbeit. Universität Regensburg, Regensburg.
- Täuber, B. und Dobner, T.** (2001a). Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene* **20**(54), 7847-7854.
- Täuber, B. und Dobner, T.** (2001b). Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene* **278**(1-2), 1-23.
- Telling, G. C. und Williams, J.** (1993). The E1B 19-kilodalton protein is not essential for transformation of rodent cells in vitro by adenovirus type 5. *J Virol* **67**(3), 1600-1611.
- Teodoro, J. G., Halliday, T., Whalen, S. G., Takayasu, D., Graham, F. L. und Branton, P. E.** (1994). Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity. *J Virol* **68**(2), 776-786.
- Teodoro, J. G., Shore, G. C. und Branton, P. E.** (1995). Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* **11**(3), 467-474.
- Teodoro, J. G. und Branton, P. E.** (1997). Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol* **71**(5), 3620-3627.
- Tigges, M. A. und Raskas, H. J.** (1984). Splice junctions in adenovirus 2 early region 4 mRNAs: multiple splice sites produce 18 to 24 RNAs. *J Virol* **50**(1), 106-117.
- Tooze, J.** (1981). DNA tumor viruses. In "Cold Spring Harbor", Vol. 2nd ed., pp. 943-1054. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Torii, S., Egan, D. A., Evans, R. A. und Reed, J. C.** (1999). Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *Embo J* **18**(21), 6037-6049.
- Trentin, J. J., Yabe, Y. und Taylor, G.** (1962). The quest for human cancer viruses. *Science* **137**, 835-849.
- van den Heuvel, S. J., The, S. I., Klein, B., Jochemsen, A. G., Zantema, A. und van der Eb, A. J.** (1992). p53 shares an antigenic determinant with proteins of 92 and 150 kilodaltons that may be involved in senescence of human cells. *J Virol* **66**(1), 591-595.
- van den Heuvel, S. J., van Laar, T., The, I. und van der Eb, A. J.** (1993). Large E1B proteins of adenovirus types 5 and 12 have different effects on p53 and distinct roles in cell transformation. *J Virol* **67**(9), 5226-5234.
- Virtanen, A., Gilardi, P., Naslund, A., LeMoullec, J. M., Pettersson, U. und Perricaudet, M.** (1984). mRNAs from human adenovirus 2 early region 4. *J Virol* **51**(3), 822-831.
- Vojtesek, B., Bartek, J., Midgley, C. A. und Lane, D. P.** (1992). An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* **151**(1-2), 237-244.
- Wang, H. G., Rikitake, Y., Carter, M. C., Yaciuk, P., Abraham, S. E., Zerler, B. und Moran, E.** (1993a). Identification of specific adenovirus E1A N-terminal residues critical to the binding of cellular proteins and to the control of cell growth. *J Virol* **67**(1), 476-488.
- Wang, Q., Greenburg, G., Bunch, D., Farson, D. und Finer, M. H.** (1997). Persistent transgene expression in mouse liver following in vivo gene transfer with a delta E1/delta E4 adenovirus vector. *Gene Ther* **4**(5), 393-400.
- Waubke, R., Zur Hausen, H. und Henle, W.** (1968). Chromosomal and autoradiographic studies of cells infected with herpes simplex virus. *J Virol* **2**(10), 1047-1054.
- Weiden, M. D. und Ginsberg, H. S.** (1994). Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(1), 153-157.
- Weinberg, D. H. und Ketner, G.** (1983). A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of human adenovirus type 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(17), 5383-5386.
- Weis, K., Rambaud, S., Lavau, C., Jansen, J., Carvalho, T., Carmo-Fonseca, M., Lamond, A. und Dejean, A.** (1994). Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* **76**(2), 345-356.

- Weiss, R. S., McArthur, M. J. und Javier, R. T.** (1996). Human adenovirus type 9 E4 open reading frame 1 encodes a cytoplasmic transforming protein capable of increasing the oncogenicity of CREF cells. *J. Virol.* **70**(2), 862-872.
- White, E. und Cipriani, R.** (1990). Role of adenovirus E1B proteins in transformation: altered organization of intermediate filaments in transformed cells that express the 19-kilodalton protein. *Mol Cell Biol* **10**(1), 120-130.
- White, E., Sabbatini, P., Debbas, M., Wold, W. S., Kusher, D. I. und Gooding, L. R.** (1992). The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* **12**(6), 2570-2580.
- White, E.** (1995). Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**(Pt 3), 34-58.
- White, E.** (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* **10**, 1-15.
- White, E.** (1998). Regulation of apoptosis by adenovirus E1A and E1B oncoproteins. *Semin. Virol.* **8**, 505-513.
- Whittaker, J. L., Byrd, P. J., Grand, R. J. und Gallimore, P. H.** (1984). Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol Cell Biol* **4**(1), 110-116.
- Whyte, P., Williamson, N. M. und Harlow, E.** (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* **56**(1), 67-75.
- Wienzek, S., Roth, J. und Dobbstein, M.** (2000). E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J Virol* **74**(1), 193-202.
- Wienzek, S. und Dobbstein, M.** (2001). Viral and cellular factors that target the promyelocytic leukemia oncogenic domains strongly activate a glucocorticoid-responsive promoter. *J Virol* **75**(11), 5391-5397.
- Wilkinson, G. W., Kelly, C., Sinclair, J. H. und Rickards, C.** (1998). Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J Gen Virol* **79**(Pt 5), 1233-1245.
- Williams, J., Williams, M., Liu, C. und Telling, G.** (1995). Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **199**(Pt 3), 149-175.

- Wold, W. S., Mackey, J. K., Rigden, P. und Green, M.** (1979). Analysis of human cancer DNA's for DNA sequence of human adenovirus serotypes 3, 7, 11, 14, 16, and 21 in group B1. *Cancer Res* **39**(9), 3479-3484.
- Yamano, S., Tokino, T., Yasuda, M., Kaneuchi, M., Takahashi, M., Niitsu, Y., Fujinaga, K. und Yamashita, T.** (1999). Induction of transformation and p53-dependent apoptosis by adenovirus type 5 E4orf6/7 cDNA. *J. Virol.* **73**(12), 10095-10103.
- Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. und Nakatani, Y.** (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**(6589), 319-324.
- Yaniv, M.** (1979). Construction of hybrid viruses in vitro and their possible use for the production of specific viral or cellular proteins. *Dev Biol Stand* **42**, 87-91.
- Zalmanzon, E. S.** (1987). Transforming and oncogenic properties of the adenovirus genome. *Eksp. Onkol.* **9**(3), 3-8.
- Zantema, A., Schrier, P. I., Davis, O. A., van, L. T., Vaessen, R. T. und van der Eb, A. J.** (1985). Adenovirus serotype determines association and localization of the large E1B tumor antigen with cellular tumor antigen p53 in transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**(11), 3084-3091.
- Zhang, Y. und Xiong, Y.** (1999). Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Mol Cell* **3**(5), 579-591.
- Zhong, S., Hu, P., Ye, T. Z., Stan, R., Ellis, N. A. und Pandolfi, P. P.** (1999). A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene* **18**(56), 7941-7947.
- Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A. und Pandolfi, P. P.** (2000a). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* **95**(9), 2748-2752.
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D. und Pandolfi, P. P.** (2000b). Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med* **191**(4), 631-640.
- zur Hausen, H.** (1967). Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J. Virol.* **1**(6), 1174-1185.
- zur Hausen, H.** (1996a). Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1288**, F55-F78.

zur Hausen, H. (1996b). Viruses in human tumors--reminiscences and perspectives. *Adv Cancer Res* **68**, 1-22.

Veröffentlichungen

Artikel in Fachzeitschriften

Nevels, M., Täuber, B., Kremmer, E., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T. (1999). Transforming Potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J. Virol.* **73**, 1591-1600.

Nevels, M., Täuber, B., Spruss, T. Wolf, H. und Dobner, T. (2001). „Hit-and-Run“ transformation by adenovirus oncogenes. *J. Virol.* **75**, 3089-3094.

Oswald, F., Täuber, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., Liptay, S. und Schmid, R. M. (2001). p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7761-7774.

Täuber, B. und Dobner, T. (2001). Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene* **278**, 1-23.

Täuber, B. und Dobner, T. (2001). Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene* **20**, 7847-7854.

Täuber, B., Nevels, M. und Dobner, T. (2002) Identification of p300 as a cellular target of E4orf3-interaction. Manuskript in Vorbereitung.

Täuber, B., Bunse, A. und Dobner, T. (2002) Oncogenic transformation of primary rabbit lens epithelial cells by Adenovirus type 5 E1 and E4 oncoproteins. Manuskript in Vorbereitung.

Vorträge bei Fachtagungen

Nevels, M., Täuber, B., Kremmer, E., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T.: Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *Small DNA Tumor Viruses Meeting, Madison/USA, 14. – 19. Juli 1998.*

Dobner, T., Täuber, B., Rubenwolf, S., Wolf, H. und Nevels, M.: Neue Mechanismen Adenovirus-vermittelter Onkogenese. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Bremen, 9. - 12. März 1999.*

Nevels, M., Täuber, B., Spruss, T. Wolf, H. und Dobner, T.: „Hit & Run“-Transformation durch adenovirale Onkogene. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien, 26. – 29. April 2000.*

Täuber, B., Nevels, M., Wolf, H. und Dobner, T.: Identification of p300 as a cellular target of E4orf3-Interaction. *Small DNA Tumor Viruses Meeting, Madison/USA, 8. - 13. Juli 2000.*

Nevels, M., Täuber, B., Spruss, T. und Dobner, T.: „Hit & Run“-Transformation by adenovirus oncogenes. *Small DNA Tumor Viruses Meeting, Madison/USA*, 8. - 13. Juli 2000.

Täuber, B., Bunse, A. und Dobner, T.: Efficient transformation of primary human epithelial cells by adenovirus type 5 E1 and E4 oncoproteins. *Small DNA Tumour Virus Meeting „DNA Tumour Viruses and Cell Cycle Regulation in Cancer“*, Cambridge/UK, 24. - 29. Juli 2001.

Kzhyshkowska, J., Rusch, A., Täuber, B., Wolf, H. und Dobner, T.: E1B-55 kDa associated protein E1B-AP5 is a regulator of transcription. *Small DNA Tumour Virus Meeting „DNA Tumour Viruses and Cell Cycle Regulation in Cancer“*, Cambridge/UK, 24. - 29. Juli 2001.

Posterpräsentationen bei Fachtagungen

Nevels, M., Täuber, B., Spruss, T., Kremmer, E., Wolf, H. und Dobner, T.: Transformierende Eigenschaften der E4orf6- und E4orf3-Proteine von Adenovirus Typ 5. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Regensburg*, 2. - 5. März 1998.

Täuber, B., Nevels, M., Kremmer, E., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T.: Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Bremen*, 9. - 12. März 1999.

Nevels, M., Täuber, B., Wolf, H. und Dobner, T.: „Hit & Run“-Transformation durch E1- und E4-Genprodukte von Adenovirus Typ 5. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Bremen*, 9. - 12. März 1999.

Täuber, B., Nevels, M., Kremmer, E., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T.: Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *Small DNA Tumour Viruses Meeting, Cambridge/UK*, 13. - 18. Juli 1999.

Täuber, B., Nevels, M., Wolf, H. und Dobner, T.: Identifizierung von p300 als zellulärem Interaktionspartner von E4orf3. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien*, 26. - 29. April 2000.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen April 1998 und Februar 2002 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis danke ich vielmals für die Bereitschaft zur Übernahme des Erstgutachtens.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Dobner für seine Motivation und tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit. Sein unermüdliches Engagement hat sehr zum Gelingen dieses Projektes beigetragen.

Den dicken Dobners danke ich für das durchaus nette und lustige Arbeitsklima. Insbesondere bedanke ich mich bei meinen Korrekturlesern Barbara Härtl, Tanja Lukas, Thomas Zeller, André Rusch und Arnd Dankesreiter. Weiterhin gilt mein Dank meinen beiden „Meistern“ Peter Groitl und Michael Nevels.

Bei Holger Melzl möchte ich mich für die Sequenzierarbeiten bedanken.

Herrn Dr. Thilo Spruß möchte ich für die permanente Bereitstellung von Ratten und Nacktmäusen sowie der Anfertigung von histologischen Schnitten danken. In diesem Zusammenhang danke ich auch besonders Herrn Franz Wiesenmeyer und Herrn Oskar Baumann für die hervorragende technische Assistenz.

Ein Dankeschön gilt auch Herrn Dr. Arnd Bunse für die Bereitstellung von Kaninchenzellen.

Ein besonderer Dank richtet sich an meine Eltern und André.

